

Université de Montréal

Étude des mécanismes de surenroulement de l'ADN induit par la transcription
chez *Escherichia coli*.

par

Sonia Broccoli

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophia Doctoris (Ph.D.) en
microbiologie et immunologie

Septembre, 2003

©Sonia Broccoli, 2003



W

4

U58

2004

V.040

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Étude des mécanismes de surenroulement de l'ADN induit par la transcription
chez *Escherichia coli*.

présentée par
Sonia Broccoli

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr George Szatmari.....	Président- Rapporteur
Dr Marc Drolet.....	Directeur de recherche
Dr Pierre Belhumeur.....	Membre du jury
Dr Benoît Cousineau.....	Examineur externe
Dr Léa Brakier-Gingras.....	Représentante du doyen

Thèse acceptée le mercredi 3 mars, 2004

Sommaire

Les topoisomérases ont des fonctions variées dans le métabolisme de l'ADN. La topoisomérase I et la gyrase jouent des rôles inestimables durant la transcription. La transcription sans topoisomérase I peut générer des plasmides hypersurenroulés négativement. Historiquement, la formation d'hyper-surenroulement était liée à la co- transcription/traduction de gènes plasmidiques comme *tetA* dont les produits sont ancrés à la membrane. Selon le « Twin-Domain Model », cet ancrage empêche toute rotation de la polymérase et cette rigidité en absence de topoisomérase I se traduit par une accumulation démesurée de supertours négatifs. L'hypersurenroulement peut aussi être le résultat de R-loops. Les R-loops ont lieu préférentiellement lorsque l'ARN demeure non traduit (ARNr) ou lorsque la transcription/traduction sont découplées chez les mutants *topA*.

Dans le but de mieux comprendre les facteurs qui régulent la formation de R-loops chez *E. coli*, nous avons tenté d'isoler des supresseurs multicopie de *topA* en employant un système de clonage *in vivo* avec le phage mini- Mu. Nous avons isolé le gène *topB* qui code pour la topoisomérase III et le gène *rnhA* qui code pour la RNase HI. Nous avons trouvé que la topoisomérase III peut relaxer le surenroulement négatif généré par la transcription *in vivo* et *in vitro*, que le R-loop est un « hot-spot » de relaxation pour cette dernière, et que la surexpression de la topoisomérase III *in vivo* empêche l'hypersurenroulement. La surexpression simultanée de la topoisomérase III et de la RNase HI a un effet synergique sur la croissance des mutants *topA*.

Afin de mieux comprendre l'importance du couplage de la transcription/traduction dans la prévention des R-loops, nous avons analysé la sensibilité des plasmides hypersurenroulés à la surproduction de la RNase HI et employé diverses méthodes pour inhiber la traduction spécifiquement ou non spécifiquement. Nous avons également effectué des études de Northern afin

d'évaluer l'effet de la surproduction de la RNase HI sur la synthèse des ARNs. Nos résultats suggèrent que l'inhibition de la traduction stimule la formation d'hypersurenroulement par deux mécanismes : en libérant les ARNs des ribosomes ce qui peut favoriser la formation de R-loops, et en augmentant la demi-vie des ARNs suite à une pénurie de ribonucléases en raison d'une séquestration de ces dernières à l'ARNr. Ainsi, des transcrits plus longs peuvent stimuler l'hypersurenroulement de type « Twin-Domain Model » par effet de masse, ce qui est soutenu par l'observation qu'une mutation dans l'ARN polymérase qui cause une accumulation d'ARNs courts abolit ce type d'ADN. L'ADN hypersurenroulé libre existe donc *in vivo* et la formation de R-loops peut être une conséquence de l'hypersurenroulement. La RNase HI peut alors éliminer cet ADN en dégradant l'hybride qui le contraint, le rendant ainsi accessible pour la relaxation par la gyrase. Nos résultats suggèrent que la topoisomérase I, la gyrase, le ratio ATP/ADP, la topoisomérase III, la topoisomérase IV, l'ARN polymérase, la RNase HI et autres ribonucléases sont des régulateurs *en trans* de la formation d'hypersurenroulement, alors que la longueur du transcrit joue plutôt un rôle *en cis* dans l'accumulation de plasmides hypersurenroulés.

Mots clés : *E. coli*, transcription, hypersurenroulement, « Twin-Domain Model », R-loops, topoisomérases, inhibition de la traduction, pénurie de RNases, ratio ATP/ADP

Summary

Topoisomerases accomplish many functions in DNA metabolism. Topoisomerase I and gyrase play substantial roles in transcription. Transcription in the absence of topoisomerase I can result in the formation of hypernegatively supercoiled plasmid DNAs. Historically, hypernegative supercoiling has been linked to the coupled transcription and translation of plasmid- borne membrane-bound proteins such as TetA. According to the Twin- Domain Model, this anchorage blocks the RNA polymerase from rotating and in the absence of topoisomerase I, this results in an accumulation of negative supercoils. Hypernegative supercoiling of plasmid DNAs can also result from R-loop formation. R-loops occur preferentially when the transcript remains untranslated (rRNA) or when transcription and translation are uncoupled. R-loop formation is the greatest consequence of the absence of *topA* in *E. coli*.

In order to better understand the factors which regulate R-loop formation in *E. coli*, we sought to isolate multicopy suppressors of a *topA* mutation by using an *in vivo* cloning system with the mini-Mu phage. We isolated *topB* which encodes topoisomerase III and *rnhA* which encodes RNase HI. We found that topoisomerase III can relax transcription- induced negative supercoils *in vivo* and *in vitro*, that R-loops are hot- spots for relaxation by topoisomerase III and that the *in vivo* overexpression of this enzyme can prevent hypernegative supercoiling. The overexpression of both topoisomerase III and RNase HI has a synergistic effect on the growth of *topA* null mutants.

In order to study the importance of coupled transcription/translation in the inhibition of R-loop formation, we evaluated the sensitivity of hypernegatively supercoiled plasmids to RNase HI overproduction and we used several methods to specifically or non specifically inhibit protein synthesis. We also performed Northern analysis to evaluate the effects of overproducing RNase HI on full-length RNA synthesis. Our results suggest that the inhibition of translation

promotes hypernegative supercoiling in two ways: by freeing RNAs of ribosomes which can stimulate R-loop formation, and by increasing their half- life due to a shortage of ribonucleases caused by a sequestration of these enzymes to newly synthesized rRNA. Longer RNAs can promote hypernegative supercoiling by the “Twin- Domain” mechanism by increasing frictional drag, as shown by the fact that a mutation in the RNA polymerase which inhibits full- length RNA synthesis also abolishes this form of DNA. Hypernegative supercoiling can therefore exist in a free state inside the cell and can be a major cause of R-loop formation. RNase HI can eliminate hypernegative supercoiling by degrading the R-loop which constrains it, thus rendering it accessible for relaxation by DNA gyrase. Our results suggest that topoisomerase I, DNA gyrase, the ATP/ADP ratio, topoisomerase III, topoisomerase IV, RNA polymerase, RNase HI and other ribonucleases are *trans* regulators of hypernegative supercoiling whereas the length of the transcript plays a more *cis* role in the accumulation of hypernegatively supercoiled plasmid DNAs.

Key words: *E. coli*, transcription, hypernegative supercoiling, Twin- Domain Model, R-loops, topoisomerases, protein synthesis inhibition, RNase shortage, ATP/ADP ratio

Table des matières

Identification du jury	ii
Sommaire en français	iii
Sommaire en anglais	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xiii
 1. Introduction	 1
 1.1. Surenroulement de l'ADN chez <i>Escherichia coli</i>	 2
1.1.1. Surenroulement global.....	3
1.1.2. Surenroulement local.....	5
1.1.3. Propriétés du surenroulement.....	7
 1.2. Les ADN topoisomérases	 9
1.2.1. Classification des ADN topoisomérases.....	9
1.2.2. La topoisomérase I.....	12
1.2.3. La gyrase (topoisomérase II).....	14
1.2.4. La topoisomérase III.....	15
1.2.5. La topoisomérase IV.....	17
 1.3. Transcription et hypersurenroulement	 18
1.3.1. Transcription du gène <i>tetA</i> de pBR322 chez les mutants <i>topA</i> de <i>Escherichia coli</i>	19
1.3.2. Formation de R-loops en absence de topoisomérase I.....	20
1.3.2.1. Formation de R-loops <i>in vitro</i> en absence de topoisomérase I.....	21
1.3.2.2. Formation de R-loops <i>in vivo</i> chez les mutants <i>topA</i> de <i>E. coli</i>	24
1.3.3. Effet de la température sur la formation de R-loops chez <i>E. coli</i>	26

1.4. Rôles biologiques connus des R-loops chez <i>E. coli</i>	29
1.4.1. Réplication du chromosome à <i>oriC</i>	29
1.4.2. Réplication des plasmides de type ColE1.....	30
1.4.3. La réplication par cSDR	32
1.5. Rôles biologiques connus des R-loops chez certains organismes eucaryotes	33
1.5.1. Réplication de l'ADN mitochondrial.....	33
1.5.2. Permutation de classe des immunoglobulines.....	36
2. Résultats	39
2.1. « Isolation of the <i>topB</i> gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of <i>topA</i> null mutations in <i>Escherichia coli</i>. » par Broccoli <i>et al.</i>, 2000	40
2.2. « Effects of RNA polymerase modifications on transcription- induced negative supercoiling and associated R-loop formation. » par Broccoli <i>et al.</i>, 2004	80
3. Discussion	120
4. Conclusion et perspectives	154
5. Bibliographie	160
6. Annexe	192
7. Remerciements	199

Liste des tableaux

Dans la section 1. Introduction

Tableau I. Propriétés des topoisomérases de <i>E. coli</i>.....	14
--	-----------

Dans la section 2. Résultats

- 2.1. « Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. » par Broccoli *et al.*, 2000.**

« Table I. Bacterial strains used in this study. ».....	64
--	-----------

« Table II. Multicopy suppressors of the <i>topA</i> null mutant RFM480 isolated at different temperatures. ».....	65
---	-----------

« Table III. Ratio of colonies at 28°C or 21°C to colonies at 37°C. ».....	69
---	-----------

- 2.2. « Effects of RNA polymerase modifications on transcription- induced negative supercoiling and associated R-loop formation. » par Broccoli *et al.* 2004**

« Table I. List of <i>E. coli</i> strains used in this study. ».....	119
---	------------

Liste des figures

Dans la section 1. Introduction

Figure 1. Surenroulement de l'ADN.....	3
Figure 2. Organisation du chromosome de <i>E. coli</i>.....	4
Figure 3. Modèle du « Twin- Supercoiling Domain ».....	6
Figure 4. Propriétés du surenroulement.....	8
Figure 5. Surenroulement libre vs. contraint.....	9
Figure 6. Mécanisme de la formation de l'hypersurenroulement.....	27

Dans la section 2. Résultats

2.1. « Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. » par Broccoli *et al.*, 2000.

Figure 1. « Complementation of the growth defect of a <i>topA</i> null mutant by topoisomerase III overproduction at different temperatures on solid LB media. ».....	66
Figure 2. « Complementation of the growth defect of a <i>topA</i> null mutant by topoisomerase III at 28°C in liquid LB media. ».....	68
Figure 3. « Topoisomerase III relaxes transcription- induced negative supercoiling <i>in vitro</i>. ».....	70

Figure 4. « Topoisomerase III relaxes transcription- induced negative supercoiling <i>in vivo</i>. ».....	71
Figure 5. « An R-looped DNA template is efficiently relaxed by DNA topoisomerase III <i>in vitro</i>. ».....	72
Figure 6. « Overproduction of topoisomerase III reduces the formation of R-loop- dependent hypernegatively supercoiled DNA in a <i>topA</i> null mutant. ».....	73
Figure 7. « Overproduction of topoisomerase III counteracts the negative effect of overexpressing RNase H activity in a <i>topA</i> null mutant at low temperatures. ».....	74
2.2. « Effects of RNA polymerase modifications on transcription- induced negative supercoiling and associated R-loop formation. » par Broccoli <i>et al.</i>, 2004.	
Figure 1. « Mechanisms for the formation of hypernegatively supercoiled plasmid DNA in <i>Escherichia coli topA</i> mutants. ».....	107
Figure 2. « Effects of the <i>boxA</i> antitermination sequence on R-loop- dependent hypernegative supercoiling. ».....	109
Figure 3. « Effects of RNA polymerase modifications on membrane anchorage- and R-loop- dependent hypernegative supercoiling. ».....	111
Figure 4. « The effect of the <i>rpoB108</i> mutation on R-loop-dependent hypernegative supercoiling is not restricted to ColE1-type plasmids.».....	114

Figure 5. « Spectinomycin stimulates R-loop- dependent hypernegative supercoiling due to transcription of an untranslatable *tetA* gene. »....115

Figure 6. «Spectinomycin stabilizes *tetA* mRNA. ».....117

Figure 7. «Spectinomycin stabilizes hypernegatively supercoiled DNA.».....118

Dans la section 6. Annexe

Figure 1. La transcription dans l'orientation physiologique du fragment *HindIII* de l'opéron *rrnB* de *E. coli* cause des arrêts de fourches de réplication sur le plasmide qui le porte.....193-194

Figure 2. Filamentation et distribution anormale du matériel génétique du mutant double $\Delta topA \Delta rnhA$ conditionnel.....195

Figure 3. Niveau de surenroulement global très relaxé chez le mutant double $\Delta topA \Delta rnhA$ conditionnel.....196

Figure 4. Surexpression des sous- unités de la topoisomérase IV chez le mutant double $\Delta topA \Delta rnhA$ conditionnel.....197

Figure 5. Hypersurenroulement de pBR322 à 37°C en présence de spectinomycine chez la souche DM800.....198

Liste des abréviations

A : adénine
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
AP : ampicilline
AP^R : résistance à l'ampicillin
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert
ATP : adénosine triphosphate
C : cytosine
CaCl₂ : chlorure de calcium
Cm : chloramphénicol
Cm^R : résistance au chloramphénicol
cSDR : « constitutive Stable DNA Replication »
C-terminal : carboxy-terminal
°C : degrés Celcius
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
Δ : délétion
σ : densité de surenroulement
E. coli : *Escherichia coli*
Fig. : figure
G : guanine
h : heure(s)
Ig : immunoglobuline
IPTG : isopropylthio-β-D-galactoside
kb : kilobase(s)
kDa : kiloDalton(s)
Km : kanamycine
Km^R : résistance à la kanamycine

Mg^{2+} : ion magnésium

μg : microgramme(s)

μl : microlitre(s)

μM : micromolaire

min : minute(s)

ml : millilitre(s)

mM : millimolaire

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

ng : nanogramme(s)

N-terminal : amino-terminal

p. : page

PAS : « Primosome Assembly Site »

pb : paires de bases

PCR : « polymerase chain reaction »

ppGpp : guanosine tétraphosphate

RNAP : « RNA polymerase »

RNase : ribonucléase

rrn : opéron de l'ARN ribosomique

SSB : « Single-Stranded DNA Binding protein »

T : thymine

Tc : tétracycline

Tc^R : résistance à la tétracycline

Ts : thermosensible

UV : ultraviolet

1. Introduction

1.1. Le surenroulement de l'ADN chez *Escherichia coli*

Les fonctions biologiques de l'ADN sont grandement influencées par la structure de la double hélice. Le surenroulement est une propriété extraordinaire des chromosomes, qu'ils soient circulaires comme chez les bactéries, ou linéaires tel que chez les organismes eucaryotes. Initialement, le surenroulement était considéré comme étant une caractéristique unique, spécifique à certains génomes viraux, plasmides bactériens et à l'ADN mitochondrial. À une certaine époque, on croyait même que le surenroulement était le résultat d'un artefact lié à l'isolement des molécules d'ADN. Depuis, on a développé une plus grande compréhension et appréciation de l'importance du surenroulement pour tous les processus biologiques reliés à l'ADN. Une molécule d'ADN est dite surenroulée positivement ou négativement si cette dernière s'enroule autour d'elle-même, respectivement dans le même sens ou dans le sens inverse par rapport à son hélicité (Sinden, 1994). C'est sans doute parce que le surenroulement négatif facilite la séparation des brins tout en assurant un certain niveau de condensation, que l'ADN chez la très vaste majorité des organismes vivants existe sous forme surenroulé négativement (voir figure 1, p. 3).

Des évidences génétiques obtenues en évaluant les conséquences de mutations dans divers gènes de topoisomérases (voir plus loin) pour la croissance et pour le surenroulement, suggèrent que le maintien d'un niveau de surenroulement précis est requis pour une croissance adéquate chez *Escherichia coli* (Drlica, 1992). Ainsi, l'initiation de la réplication (Marians *et al.*, 1986; Funnell *et al.*, 1987), l'initiation de la transcription (Arnold & Tessman, 1988; Pruss & Drlica, 1989; Chen *et al.*, 1994), le déclenchement de certains événements de recombinaison à spécificité de site (Mizuuchi *et al.*, 1978; Nash, 1990) sont tous des processus biologiques dont le déroulement normal dépend d'un niveau précis de surenroulement. Alternativement, comme nous le verrons plus loin, la réalisation de tous les mécanismes énumérés ci-dessus a des répercussions importantes pour la structure et la topologie de l'ADN.

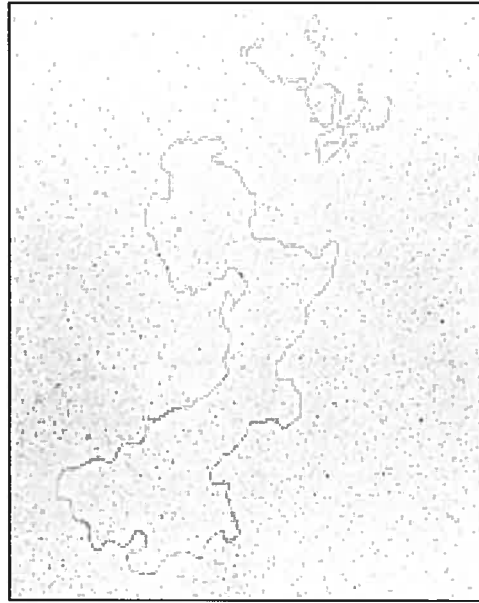


Figure 1. Surenroulement de l'ADN.

Image de deux formes d'une molécule d'ADN circulaire, l'une qui est surenroulée (haut) et l'autre qui est relaxée (bas) tel qu'observé par microscopie électronique. L'ADN représenté dans cette image est un plasmide de 9 kilobases. Tiré de Sinden, 1994; p. 98.

1.1.1. Le surenroulement global

Le chromosome de *E. coli* a été caractérisé *in vitro* dans les années 1970 à l'aide de méthodes de lyse douce, ainsi que des techniques chimiques et physiques délicates (Stonington & Pettijohn, 1971; Drlica & Riley, 1990). Ce chromosome bactérien est une grande molécule circulaire à l'intérieur de laquelle l'ADN est surenroulé négativement (Worcel & Burgi, 1972; Sinden *et al.*, 1980). Il est organisé en approximativement 50 domaines de surenroulement indépendants (voir figure 2, p. 4; Pettijohn & Sinden, 1985). Un domaine topologique est une région d'ADN dont la rotation des extrémités est empêchée par la présence d'une barrière physique comme par exemple, une protéine ou un complexe protéique. Le surenroulement global se définit comme étant la moyenne de surenroulement de tous les domaines de surenroulement.

La densité de surenroulement (σ) est la moyenne de supertours par rapport au nombre de tours d'hélice dans l'ADN (Sinden, 1994). Cette densité de surenroulement peut être calculée à l'aide de la formule $\sigma = 10.5 \tau / N$ où τ représente le nombre de supertours et N est égal au nombre de paires de bases total de la molécule d'ADN en question. Le chiffre 10.5 indique le nombre moyen de paires de bases par tour d'hélice dans l'ADN en solution chez *E. coli* (Sinden, 1994). Ainsi, pour une molécule de 525 paires de bases avec 3 supertours négatifs (-3), la densité de surenroulement serait de -0.06. Chez *E. coli*, la moyenne de densité de surenroulement (σ) se situe entre -0.025 et -0.05 (Bliska & Cozarelli, 1987).

Des évidences génétiques obtenues à l'aide de divers mutants de topoisomérases suggèrent que le maintien du surenroulement global à l'intérieur d'une marge de $\pm 15\%$ est nécessaire pour une croissance adéquate chez *E. coli* (Drlica, 1992).

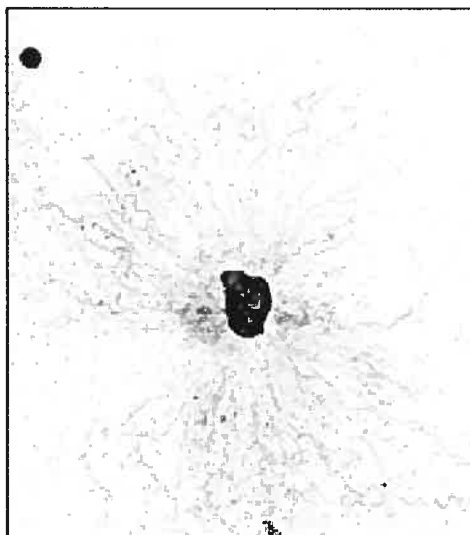


Figure 2. Organisation du chromosome de *E. coli*.
Image de microscopie électronique du chromosome de *E. coli* organisé en plusieurs domaines de surenroulement.
Tiré de Drlica & Riley, 1990; p. 178.

Cette organisation chromosomique en domaines indépendants de surenroulement peut conférer de nombreux avantages à la bactérie. Sachant que plusieurs gènes sont transcrits de façon optimale à un niveau de surenroulement précis, une régulation différentielle du surenroulement entre les divers domaines pourrait influencer l'expression de ces derniers (Drlica, 1984; Esposito & Sinden, 1988; Freeman & Gerrard, 1992). De plus, cette organisation protégerait le chromosome d'une relaxation complète si un bris survenait dans l'ADN à un endroit donné, puisque seulement le domaine en question serait relaxé alors que les autres seraient en mesure de maintenir leur énergie de surenroulement, grâce aux barrières protéiques qui séparent les divers domaines. Plusieurs questions existent encore en ce qui concerne l'organisation du chromosome *in vivo*. Il n'y a toujours pas de preuves scientifiques pour supporter la notion que le niveau de

surenroulement puisse différer considérablement parmi les divers domaines. De plus, il est toujours inconnu si l'organisation du chromosome varie en fonction de la phase de croissance ou de la température. On ne connaît pas plus les protéines ou complexe(s) protéique(s) exact(e)(s) qui définissent un domaine quoique des études récentes suggèrent que la protéine SeqA qui lie préférentiellement l'ADN hémiméthylé suite au passage de la fourche de réplication pourrait être impliquée (Hiraga *et al.*, 1998; Weitao *et al.*, 1999; Sawitzke & Austin, 2001; Løbner-Olesen *et al.*, 2003). En effet, une cinquantaine de foci SeqA ont été comptés chez des cellules de *E. coli*, soit un nombre comparable à celui estimé pour le nombre de domaines du chromosome bactérien (Løbner-Olesen *et al.*, 2003).

1.1.2. Le surenroulement local

Le surenroulement local est le résultat d'activités sur le chromosome. Les processus biologiques tels que la transcription, la réplication ou la recombinaison homologue impliquent tous l'action de protéines ou complexes protéiques qui se déplacent le long de la matrice ADN. Le mouvement de ces complexes protéiques entraîne des problèmes topologiques inhérents à la structure même de la double hélice. En 1987, Liu et Wang (Liu & Wang, 1987) se sont penchés sur le mécanisme de la transcription et ont étudié les conséquences du déplacement du complexe transcriptionnel pour le surenroulement de l'ADN. Selon leur modèle appelé le « Twin- Supercoiling Domain Model for Transcription », des domaines transitoires de surenroulement très élevé sont générés durant la transcription. Un schéma de leur modèle est présenté à la figure 3 de la page 6. Même si elle est de taille considérablement importante, l'ARN polymérase peut en elle-même tourner autour de l'ADN (Cook *et al.*, 1992). Par contre, au fur et à mesure que le transcrit est allongé et que les ribosomes s'y attachent afin d'initier la traduction, le complexe atteint des dimensions tellement importantes qu'il devient incapable d'effectuer des rotations autour de l'ADN, obligeant ainsi la double hélice à tourner autour d'elle-même. Par conséquent, des domaines de surenroulement positif et négatif sont générés respectivement en avant et en arrière du complexe

transcriptionnel. Ce modèle a été confirmé par de nombreuses études expérimentales (Wu *et al.*, 1988; Tsao *et al.*, 1989; Ostrander *et al.*, 1990; Drolet *et al.*, 1994).

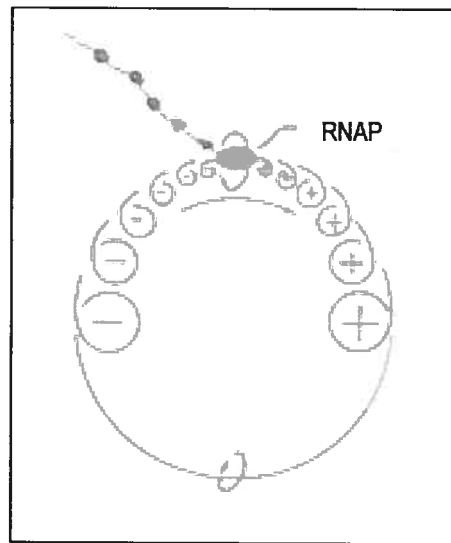


Figure 3. Modèle du « Twin-Supercoiling Domain »
La transcription génère des domaines de surenroulement positif et négatif respectivement en avant et en arrière du complexe transcriptionnel. Ces supertours peuvent diffuser et s'annuler l'un l'autre au point de rencontre. Tiré de Wu *et al.*, 1988.

Puisque la fourche de réplication procède à une vitesse approximativement dix fois plus importante que celle du complexe de transcription, il n'était pas surprenant de constater que la réplication pouvait également occasionner des problèmes topologiques importants pour la cellule (Postow *et al.*, 2001). Parce que les chromosomes nouvellement synthétisés sont séparés au fur et à mesure que la fourche de réplication avance, l'accumulation majeure de surenroulement se situe principalement en avant de cette dernière. Bien que le surenroulement local soit transitoire, il peut atteindre des niveaux extraordinaires, bien supérieurs à ceux observés pour le surenroulement global. Il est donc primordial pour la cellule que le surplus de surenroulement soit annulé le plus rapidement possible afin de conserver un métabolisme normal de l'ADN.

1.1.3. Propriétés du surenroulement

Il existe plusieurs termes pour définir les différentes formes de surenroulement. En plus d'être positif ou négatif tel que décrit précédemment, le surenroulement peut être caractérisé de plectonémique, toroïdal, contraint ou libre (Kornberg & Baker, 1992; Sinden, 1994). Une molécule d'ADN est surenroulée de façon plectonémique lorsque cette dernière s'enroule autour d'elle-même, créant une situation où la structure même de la double hélice absorbe la tension de surenroulement. Lorsqu'une molécule est surenroulée de façon plectonémique, le nombre de paires de bases par tour d'hélice peut varier en fonction du degré de surenroulement. Ainsi, le nombre de paires de bases par tour d'hélice augmente au fur et à mesure que l'ADN est relaxé. Le surenroulement plectonémique est la forme prédominante d'ADN surenroulé trouvée en solution.

Alternativement, une molécule d'ADN est dite surenroulée de façon toroïdale lorsque cette dernière s'enroule autour de quelque chose, comme par exemple, un complexe protéique. Dans cette situation, la tension de surenroulement est absorbée par la torsion de l'axe de la double hélice autour de lui-même. L'ADN est surenroulé de manière toroïdale chez les eucaryotes puisqu'il s'enroule autour des histones afin de former les nucléosomes. Chez les bactéries, l'ADN est également parfois surenroulé de façon toroïdale. Lorsqu'on observe le chromosome de *E. coli* au microscope électronique, ce dernier est condensé et dans certaines régions, il semble être organisé de façon analogue aux chromosomes eucaryotes (Griffith, 1976). Il existe chez *E. coli* des protéines semblables aux histones qui peuvent modifier la structure de l'ADN mais qui ne sont pas présentes en assez grand nombre pour assumer par elles-mêmes le rôle de l'organisation du chromosome. Les protéines HU, Fis et IHF font partie de cette famille et elles peuvent modifier l'architecture de l'ADN dans certaines situations pour stimuler divers processus biologiques mais tel que mentionné, elles ne contribuent pas significativement au contrôle du niveau de surenroulement du chromosome (Kornberg & Baker, 1992). Un schéma

représentant le surenroulement plectonémique et toroïdal est présenté à la figure 4.

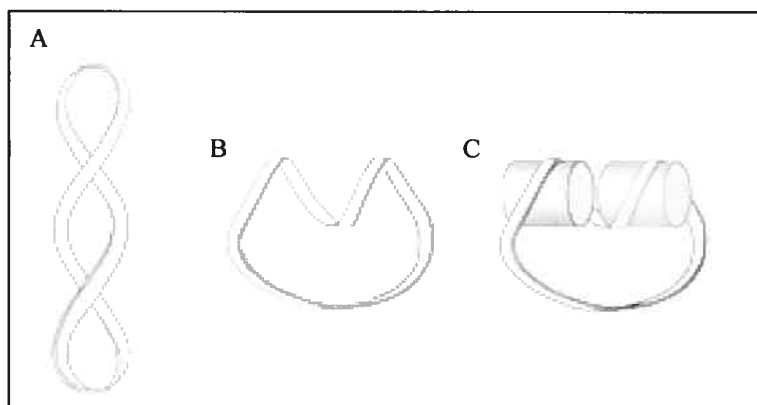


Figure 4. Propriétés du surenroulement.

A) Molécule d'ADN surenroulée de manière plectonémique avec 2 supertours négatifs. B) Molécule d'ADN surenroulée de façon toroïdale avec deux supertours négatifs. C) L'ADN surenroulé de manière toroïdale *in vivo* est généralement associé avec des protéines. Tiré de Sinden, 1994; p 105.

Lorsque la tension de surenroulement est absorbée par la double hélice et que les supertours peuvent diffuser, on dit que le surenroulement est libre. Dans ce cas, une brisure dans l'ADN peut occasionner une relaxation complète de la molécule d'ADN. Alternativement, une région d'ADN qui s'enroule autour de certaines protéines ou complexes protéiques de façon stable crée une situation où le surenroulement est contraint (voir figure 5, p. 9). Ainsi, même si une cassure est introduite dans l'ADN, cette dernière n'altère pas l'état de surenroulement de la double hélice dans cette région. Il a été estimé que près de la moitié des supertours chez *E. coli* pourraient être contraints (Pettijohn & Pfenninger, 1980).

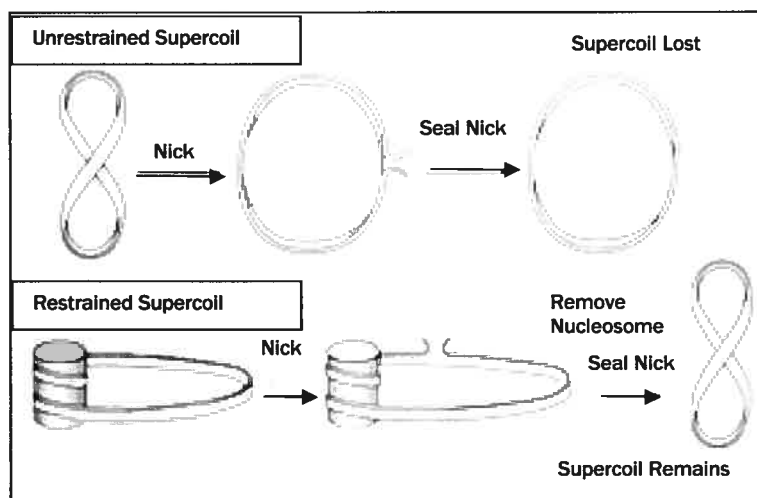


Figure 5. Surenroulement libre vs. contraint.

Lorsque le surenroulement est libre (haut), une brisure dans l'ADN cause une relaxation complète de la molécule. Lorsque le surenroulement est contraint (bas), les supertours sont conservés, même suite à une cassure dans l'ADN. Tiré de Sinden, 1994; p. 330.

1.2. Les ADN topoisomérases

Tel que décrit plus haut, divers processus biologiques affectent considérablement le surenroulement de l'ADN de façon indirecte et transitoire. Par ailleurs, certaines protéines ont pour rôle le maintien du surenroulement chez *E. coli* et font des réajustements constants afin de prévenir des variations trop importantes dans l'architecture de l'ADN.

1.2.1. Classification des ADN topoisomérases

Chez *E. coli*, le maintien du surenroulement est assuré principalement par les topoisomérases (Wang, 1996; Wang, 2002). Les topoisomérases sont des enzymes qui sont ainsi impliquées dans toutes les fonctions génomiques de la

cellule. Ces enzymes modifient le niveau de surenroulement de l'ADN en introduisant des coupures transitoires dans la double hélice tout en formant une liaison covalente avec l'ADN. Les topoisomérases sont classées en deux catégories selon le nombre de brins d'ADN qui sont coupés lors de la réaction enzymatique. Les topoisomérases de type I coupent un seul brin de la double hélice alors que les topoisomérases de type II génèrent une cassure double brin dans l'ADN. Ces enzymes sont également subdivisées en quatre familles IA, IB, IIA et IIB (Wang, 2002). Il est généralement admis que les membres d'une même famille sont similaires au niveau structurel et mécanistique.

Les topoisomérases de type IA relaxent spécifiquement l'ADN surenroulé négativement. Cette spécificité de substrat résulte du fait que celles-ci reconnaissent et interagissent avec des jonctions d'ADN simple brin et d'ADN double brin (Kirkegaard & Wang, 1985). Parce qu'il favorise l'ouverture des brins, un niveau approprié d'ADN surenroulé négativement est un substrat favorable pour les topoisomérases de type IA. D'ailleurs, il a été démontré que la topoisomérase I de *E. coli*, membre de la famille IA de ces enzymes, est incapable de relaxer complètement une molécule surenroulée négativement *in vitro* (Wang, 1971). Ceci s'explique par le fait qu'au fur et à mesure que l'ADN est relaxé, sa qualité en tant que substrat pour la topoisomérase I diminue et la compétence de cette enzyme à relaxer l'ADN est progressivement réduite.

Les topoisomérases IA relaxent l'ADN surenroulé négativement en clivant de façon transitoire un brin de la double hélice et en passant le brin intact au-travers de cette cassure tout en retenant les extrémités du brin clivé. Ces enzymes assurent ainsi une relaxation contrôlée de l'ADN puisqu'elles empêchent la rotation libre des extrémités générées lors de la coupure (Dekker *et al.*, 2002). L'ADN est donc relaxé d'un supertour par réaction enzymatique.

Les topoisomérases de type IB coupent également un seul brin de la double hélice par réaction enzymatique. Par contre, ces dernières le font par un

mécanisme qui diffère légèrement de celui de la famille IA. Les topoisomérases de type IB coupent un brin de la double hélice mais n'en retiennent qu'une seule extrémité, permettant ainsi à l'extrémité libre de tourner autour d'elle-même. L'ADN est donc relaxé de plusieurs supertours par événement enzymatique (Stewart *et al.*, 1998). Parce qu'elles reconnaissent des structures de croisements dans l'ADN, les topoisomérases de type IB peuvent relaxer l'ADN surenroulé négativement aussi bien que l'ADN surenroulé positivement. On retrouve des topoisomérases de type IB surtout chez les eucaryotes alors qu'au moins un exemplaire de topoisomérase de type IA est présent chez tous les organismes vivants recensés à ce jour.

Les topoisomérases de type II génèrent des cassures double brin dans l'ADN et peuvent ainsi passer une double hélice complète au-travers de cette cassure. Celles-ci sont donc des candidates idéales pour effectuer des réactions de séparation de molécules circulaires interreliées. De plus, ces dernières peuvent relaxer l'ADN surenroulé négativement ou positivement par étapes de deux supertours par réaction. La gyrase bactérienne est unique dans la famille des topoisomérases de type IIA puisqu'elle en est le seul membre connu qui puisse introduire des supertours négatifs dans la double hélice en présence d'ATP. En absence d'ATP, cette dernière se comporte comme les autres topoisomérases IIA connues.

Jusqu'à tout récemment, on croyait que les topoisomérases de type II appartenaient toutes à une même famille mais la découverte de la topoisomérase VI chez *Sulfolobus shibatae* (Bergerat *et al.*, 1997) a conduit à la subdivision en familles IIA et IIB. Les topoisomérases IIA et IIB partagent de nombreuses caractéristiques mécanistiques mais elles diffèrent considérablement dans leurs structures.

Quatre topoisomérases ont été identifiées chez *Escherichia coli* et leurs propriétés respectives sont décrites dans le tableau I à la page 14. On compte deux

topoisomérases de type IA, les topoisomérases I et III, et deux topoisomérases de type IIA, la gyrase et la topoisomérase IV. Depuis la découverte de la topoisomérase I en 1971 (Wang, 1971), des recherches actives ont été entreprises afin d'identifier et clarifier le rôle cellulaire précis de chacune de ces enzymes chez la bactérie.

1.2.2. La topoisomérase I

La topoisomérase I est codée par le gène *topA* situé dans la région *cys-trp* du chromosome bactérien (Sternglanz *et al.*, 1981; Trucksis & Depew, 1981). Tel que mentionné précédemment, la topoisomérase I de *E. coli* peut relaxer l'ADN surenroulé négativement si des régions d'ADN simple brin sont exposées. Celle-ci joue un rôle important dans le maintien du surenroulement chez *E. coli* en relaxant l'ADN qui atteint des niveaux trop importants de surenroulement. Tel que décrit plus haut, des niveaux extrêmement élevés de surenroulement négatif sont générés durant la transcription. La topoisomérase I joue alors un rôle appréciable en relaxant ce surplus de surenroulement. L'importance de la topoisomérase I dans la transcription chez *E. coli* est supportée par une étude visant à étudier la relation entre la topoisomérase I de *E. coli* et la transposase Tn5 (Yigit & Reznikoff, 1999). Lorsque les auteurs de cette étude tentaient d'isoler la transposase afin de vérifier cette interaction avec la topoisomérase I bactérienne, l'ARN polymérase semblait être co-purifiée avec ces dernières. Si par contre des mutants *topA* étaient employés, l'ARN polymérase était absente. Malgré le fait que cette étude ne visait pas à étudier la question directement, les résultats de celle-ci suggéraient que la topoisomérase I bactérienne interagissait directement avec l'ARN polymérase. Cette interaction fonctionnelle a tout récemment été confirmée expérimentalement (Cheng *et al.*, 2003a). En effet, l'association entre la topoisomérase I et l'ARN polymérase implique le domaine C-terminal de la topoisomérase qui contient des motifs en doigts de zinc homologues à ceux de plusieurs facteurs de transcription, et la sous-unité β' de l'ARN polymérase. L'association de ces deux molécules semble particulièrement importante lors de

l'induction d'une réponse au stress (Cheng *et al.*, 2003a). Ceci confirme les résultats d'études précédentes qui ont démontré que la topoisomérase I était requise lorsque les cellules étaient exposées à des conditions de stress variées (Lesley *et al.*, 1990; Qi *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2003b). Il est intéressant de noter que l'association de la topoisomérase I avec l'ARN polymérase n'est pas requise afin que la topoisomérase puisse relaxer une molécule d'ADN surenroulée. D'ailleurs, l'ajout du domaine C-terminal de l'enzyme qui contient le site d'interaction avec la polymérase n'affecte pas l'activité catalytique de la topoisomérase *in vitro* (Cheng *et al.*, 2003a). Par contre, la situation est bien différente lorsque des essais de transcription sont entrepris. Lorsqu'un plasmide est transcrit *in vitro* en présence de topoisomérase I mais en absence de gyrase, ce dernier devient surenroulé positivement. Lorsque le fragment C-terminal de la topoisomérase I est inclus, cette réaction est inhibée. Il semble donc y avoir une compétition entre la topoisomérase I sauvage et le fragment C-terminal qui contient les motifs en doigts de zinc pour l'interaction avec la polymérase. Lorsque le fragment est surproduit *in vivo* chez des cellules *topA*⁺, ces dernières accumulent des plasmides surenroulés hypernégativement. En d'autres mots, ces cellules se comportent comme des mutants *topA*. Ces observations suggèrent que la topoisomérase I serait recrutée pendant la transcription afin de relaxer le surenroulement négatif généré par le mouvement de l'ARN polymérase *in vivo*.

À l'origine, des délétions *topA-cysB* laissaient croire que la topoisomérase I n'était pas essentielle chez *E. coli* (Sternglanz *et al.*, 1981). En réalité, des études subséquentes ont montré qu'une délétion ou inactivation du gène *topA* était invariablement accompagnée de mutations compensatoires situées dans les gènes *gyrA* et/ou *gyrB* qui codent pour les sous-unités de la gyrase, et qui résultaient en une baisse générale du niveau de surenroulement du chromosome (DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982).

Tableau I. Propriétés des topoisomérases de *E. coli*. Reproduit de Sinden, 1994; p.116.

Enzyme (gène(s))	Type	Taille (kDa)	Cofacteurs	Activités
Topoisomérase I (<i>topA</i>)	IA	97	Mg ²⁺	Relaxe l'ADN surenroulé négativement par étapes d'un supertour par réaction enzymatique.
Gyrase (<i>gyrA</i> et <i>gyrB</i>)	IIA	GyrA 105 GyrB 95	ATP Mg ²⁺	Introduit des supertours négatifs en présence d'ATP. Relaxe l'ADN surenroulé négativement et positivement en absence d'ATP. Modifie le surenroulement de deux supertours par réaction enzymatique.
Topoisomérase III (<i>topB</i>)	IA	73.2	Mg ²⁺	Décatéation. Relaxe l'ADN surenroulé négativement par étapes d'un supertour par réaction enzymatique
Topoisomérase IV (<i>parC</i> et <i>parE</i>)	IIA	ParC 75 ParE 70	ATP Mg ²⁺	Relaxe l'ADN surenroulé positivement ou négativement comme la gyrase. Incapable d'introduire des supertours dans l'ADN. Décatéation

1.2.3. La gyrase (topoisomérase II)

La gyrase est une topoisomérase spécifique aux bactéries qui a été décrite pour la première fois en 1976 (Gellert *et al.*, 1976). Elle est composée des sous-unités GyrA et GyrB qui forment un tétramère fonctionnel A₂B₂ (Reece & Maxwell, 1991; Wigley, 1995). Le domaine N-terminal de la sous-unité GyrA contient le site actif qui coupe l'ADN alors que le domaine C-terminal de GyrA lie l'ADN afin de l'enrouler autour du tétramère. Quant à GyrB, son domaine N-terminal est impliqué dans la liaison et hydrolyse de l'ATP alors que le domaine C-terminal de GyrB est responsable du passage d'une double hélice complète au travers de la coupure.

La gyrase est une topoisomérase de type IIA distincte. Elle peut relaxer l'ADN surenroulé positivement ou négativement en introduisant une cassure double brin dans l'ADN se comportant ainsi comme une topoisomérase de type IIA typique. En présence d'ATP par contre, la gyrase possède la capacité d'introduire des supertours négatifs dans l'ADN (Wang, 1996; Wang, 2002). Cette propriété unique rend la gyrase essentielle chez *E. coli*. Lors de la

réplication ou de la transcription, la gyrase est la seule enzyme qui puisse éliminer les supertours positifs qui s'accumulent suite à la progression de l'ADN ou l'ARN polymérase au- travers de la double hélice. Il est intéressant de noter que le ratio ATP/ADP intracellulaire peut influencer le niveau d'activité de la gyrase et par conséquent, peut jouer un rôle dans la régulation globale des niveaux de surenroulement du chromosome (Hsieh *et al.*, 1991; Drlica, 1992).

Le débat sur quelles topoisomérases sont impliquées dans le maintien du surenroulement global chez *E. coli* s'est étiré sur plusieurs années. Si l'on considère les propriétés des topoisomérases III et IV (voir plus loin), il est logique de conclure que la topoisomérase I est l'activité de relaxation principale dans la cellule. En relaxant le surenroulement négatif généré par la transcription, celle-ci empêche le chromosome d'atteindre des niveaux de surenroulement incompatibles avec un métabolisme normal de l'ADN. La gyrase, de par sa capacité à introduire du surenroulement négatif dans l'ADN, prévient une relaxation trop importante du chromosome.

1.2.4. La topoisomérase III

La topoisomérase III est codée par le gène *topB* chez *Escherichia coli*. À l'origine, cette seconde topoisomérase de type IA avait été identifiée comme enzyme pouvant relaxer l'ADN tout comme la topoisomérase I (Dean *et al.*, 1983; Srivenugopal *et al.*, 1984). Par contre, la spécificité de substrat de la topoisomérase III semblait être considérablement plus élevée, de sorte que pour obtenir une efficacité de relaxation comparable à celle de la topoisomérase I, la réaction devait être effectuée à 52°C (DiGate & Mariani, 1988). Cette température non physiologique permet vraisemblablement l'exposition de plus grandes régions d'ADN simple brin. Dans cette même étude, une autre propriété de la topoisomérase III a été identifiée puisque les auteurs ont montré que cette dernière pouvait effectuer la séparation des intermédiaires de réplication du plasmide pBR322 *in vitro* (DiGate & Mariani, 1988). Cette activité de

décaténation de la topoisomérase III est d'ailleurs beaucoup plus efficace que celle de relaxation puisqu'elle s'effectue considérablement bien à 30°C. Il a d'ailleurs été récemment démontré que la topoisomérase III pouvait effectuer la décaténation des chromosomes à la fin de la réplication chez des cellules de *E. coli* dépourvues d'activité topoisomérase IV (Nurse *et al.*, 2003).

La délétion du gène *topB* entraîne peu de conséquences chez *E. coli*. Les mutants *topB* font preuve d'un phénotype d'hyperrecombinaison à l'intérieur de séquences répétées directes (Schofield *et al.*, 1992). Contrairement aux mutants *topA*, les mutants *topB* de *E. coli* ne semblent pas acquérir de mutations compensatoires et croissent relativement bien (DiGate & Marians, 1989). Bien que l'inactivation de l'une ou l'autre des topoisomérases IA de *E. coli* soit possible, un double mutant *topA topB* est non viable (Zhu *et al.*, 2001). Ceci peut indiquer soit que ces deux topoisomérases partagent une fonction cellulaire précise et que la présence d'au moins une topoisomérase de type IA est requise pour la survie de la bactérie, soit que l'absence de l'une entraîne des conséquences qui ne peuvent être résolues que par la seconde.

Le rôle cellulaire précis de la topoisomérase III chez *E. coli* demeure peu connu malgré le fait que des études récentes suggèrent que cette dernière serait impliquée dans la recombinaison homologe, plus spécifiquement dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologe. En effet, l'inactivation du gène *recA* permet la survie d'un double mutant *topA topB* (Zhu *et al.*, 2001). Ce résultat laisse supposer que la topoisomérase III agirait en aval de RecA, possiblement au niveau d'un intermédiaire de recombinaison. L'action de la topoisomérase III pourrait occasionnellement (ou toujours) nécessiter une association avec une hélicase. Une interaction fonctionnelle a été démontrée entre la topoisomérase III de *Saccharomyces cerevisiae* qui est une topoisomérase de type IA et l'hélicase Sgs1, une hélicase de la famille RecQ de *E. coli* (Gangloff *et al.*, 1994; Bennett *et al.*, 2000). C'est la présence de RecQ qui permet d'ailleurs la décaténation de deux molécules circulaires interreliées par la topoisomérase III

de *E. coli in vitro* (Harmon *et al.*, 1999) Il existe cinq homologues de RecQ chez l'humain et des études ont montré que plusieurs d'entre elle sont parfois associées à une topoisomérase de type IA (Shimamoto *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000). Le modèle accepté actuellement propose que l'hélicase de la famille RecQ serait impliquée dans la formation d'une structure et que celle-ci serait par la suite résolue par la topoisomérase III.

1.2.5. La topoisomérase IV

La topoisomérase IV est un hétérotétramère formé des sous-unités ParC et ParE (Peng & Marians, 1993a). La sous-unité ParC est responsable de la liaison à l'ADN et de la coupure de la double hélice alors que la sous-unité ParE contient le domaine de liaison et hydrolyse de l'ATP. Tout comme la gyrase, cette topoisomérase de type IIA est essentielle chez *Escherichia coli* (Kato *et al.*, 1988; Kato *et al.*, 1990). La topoisomérase IV possède deux activités majeures. Elle peut relaxer l'ADN surenroulé positivement ou négativement de façon efficace *in vitro* et elle possède également la capacité de séparer deux molécules circulaires interreliées comme les chromosomes circulaires à la fin de la réplication (Adams *et al.*, 1992; Peng & Marians, 1993b).

L'étude du rôle cellulaire de la topoisomérase IV s'est avérée plutôt difficile puisque la délétion des gènes *parC* et *parE* était impossible et l'utilisation de drogues qui inhibent la topoisomérase IV inhibaient simultanément la gyrase. La surexpression de la topoisomérase IV chez *E. coli* permettait de compenser pour la perte de la topoisomérase I (Kato *et al.*, 1990) ce qui laissait supposer que la topoisomérase IV pouvait également contribuer au maintien d'un niveau adéquat de surenroulement dans le chromosome bactérien. Des études récentes de localisation cellulaire par microscopie à fluorescence ont par contre montré que la sous-unité ParC de l'enzyme était associée à la fourche de réplication chez *E. coli* alors que la sous-unité ParE était localisée avec la protéine FtsK au site du septum au moment de la division cellulaire (Espeli *et al.*, 2003). Les conclusions

majeures de cette étude étaient que les deux sous- unités de la topoisomérase IV n'interagissaient qu'à la toute fin de la réplication, soit au moment de la division cellulaire et donc que l'activité de la topoisomérase IV est temporelle. La topoisomérase IV est nécessaire à la ségrégation des chromosomes nouvellement synthétisés mais ne semble pas impliquée dans le maintien comme tel du surenroulement du chromosome.

1.3. Transcription et hypersurenroulement

Les études de topologie ont grandement été facilitées par la réalisation que le niveau de surenroulement de plasmides extraits de cellules vivantes reflétait considérablement bien le niveau de surenroulement global du chromosome bactérien (Pruss *et al.*, 1982). Ainsi, les plasmides extraits de mutants *gyrA* et/ou *gyrB* conditionnels sont généralement plus relaxés que ceux extraits de cellules sauvages (Drlica & Snyder, 1978; von Wright & Bridges, 1981; Manes *et al.*, 1983; Steck *et al.*, 1984). Alternativement, les plasmides extraits chez les mutants *topA10* où la topoisomérase I ne retient qu'une faible activité résiduelle, sont plus surenroulés négativement que ceux extraits de cellules *topA*⁺ (Pruss *et al.*, 1982). Étrangement, les plasmides extraits de mutants de délétion ($\Delta topA$) où la topoisomérase I est complètement inactivée sont plus relaxés que les plasmides extraits de cellules *topA*⁺ (Pruss, 1982). Tel que mentionné précédemment, ceci est dû à l'accumulation de mutations compensatoires dans les gènes *gyr* chez ces cellules (DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982).

Dans certaines situations particulières, des plasmides avec un niveau de surenroulement négatif anormalement élevé ont été isolés de mutants $\Delta topA$ (Pruss, 1985; Pruss & Drlica, 1986). On a subséquentement adopté le terme hypersurenroulé pour définir cette population unique de plasmides. Il est à noter que l'étude de la topologie des plasmides est généralement effectuée par l'analyse de ces derniers par électrophorèse en présence d'un agent intercalant. La chloroquine est un de ces agents intercalants qui change la mobilité relative des

plasmides surenroulés en fonction des concentrations employées. Ainsi, les plasmides surenroulés négativement sont progressivement relaxés par des concentrations croissantes de chloroquine alors que les plasmides surenroulés positivement sont progressivement surenroulés davantage dans les mêmes conditions. Le terme hypersurenroulé est réservé aux plasmides qui ne sont aucunement résolus par la chloroquine, même à des concentrations extrêmement élevées (Pruss, 1985; Wu *et al.*, 1988). La mobilité relative de cette population n'est donc pas affectée par la présence de cet agent intercalant mais les plasmides hypersurenroulés sont relaxés lorsque traités avec la topoisomérase I de *E. coli in vitro* (Phoenix *et al.*, 1997).

1.3.1. Transcription du gène *tetA* de pBR322 chez les mutants *topA* de *E. coli*

L'observation d'hypersurenroulement a eu lieu pour la première fois dans les années 1980 avec le plasmide pBR322 (Pruss, 1985; Pruss & Drlica, 1986). Lorsque ce plasmide était extrait de mutants *topA*, on notait qu'une partie de la population extraite présentait un niveau de surenroulement négatif extrêmement élevé. Il a par la suite été déterminé que la formation de plasmides hypersurenroulés négativement dépendait de la transcription de gène *tetA* de pBR322 (Pruss, 1985; Pruss & Drlica, 1986). La délétion complète du promoteur de *tetA* abolissait l'apparition de cette population mais des délétions partielles de longueurs variables en 3' n'avaient aucune ou peu de conséquences pour l'accumulation de plasmides hypersurenroulés (Pruss & Drlica, 1986). Il en a été déduit que la transcription comme tel était nécessaire alors que le produit du gène *tetA* était dispensable à la formation de plasmides hypersurenroulés. Des études subséquentes ont démontré que de façon générale, les plasmides qui portaient des gènes dont les produits étaient ancrés à la membrane (comme *tetA*) lors de la co-transcription/traduction devenaient hypersurenroulés chez les mutants *topA* (Lodge *et al.*, 1989; Lynch & Wang, 1993). Ceci s'explique par le fait que l'ancrage à la membrane bloque toute rotation du complexe transcriptionnel autour de l'ADN. Si l'on considère le « Twin- Domain Model » de Liu et Wang

(Liu & Wang, 1987), les supertours négatifs résultant de la transcription s'accumulent en absence d'activité topoisomérase I alors que les supertours positifs sont sélectivement annulés par la gyrase (voir figure 3, p. 6).

Malgré le fait que l'hypersurenroulement des plasmides était historiquement lié à la transcription de gènes dont les produits étaient ancrés à la membrane, certaines observations ont ensuite été réalisées qui ne pouvaient être expliquées par le « Twin- Domain Model ». Ceci était le cas pour le gène *galK* dont le produit n'est aucunement ancré à la membrane cellulaire mais dont l'activation de la transcription *in cis* lorsque présent sur un plasmide peut générer de l'hypersurenroulement (Franco & Drlica, 1989). Des plasmides hypersurenroulés ont également été isolés chez des mutants *top1* de la levure *Saccharomyces cerevisiae* où l'ancrage à la membrane est peu probable dû au fait que la transcription et la traduction sont découplées chez les eucaryotes. De plus, si l'on considère les propriétés connues des topoisomérases IB qui peuvent relaxer à la fois le surenroulement positif et négatif (Wang, 1996; Wang, 2002), il est difficile d'expliquer pourquoi des quantités si extraordinaires de supertours négatifs s'accumuleraient (alors que les supertours positifs seraient relaxés) pendant la transcription chez ces cellules.

1.3.2. Formation de R-loops en absence de topoisomérase I.

Afin de mieux comprendre le rôle des topoisomérases dans la transcription chez *E. coli*, des essais de transcription *in vitro* ont été réalisés en présence concentrations variables de topoisomérase I et de gyrase, puis les conséquences pour le surenroulement du plasmide pBR322 ont été évaluées (Drolet *et al.*, 1994). Dans cette étude, une population de plasmides hypersurenroulés a été formée durant la transcription *in vitro* sur pBR322 en absence de topoisomérase I malgré le fait que l'ancrage à la membrane n'était pas un facteur contribuant tel qu'observé *in vivo*.

À leur surprise, les auteurs ont trouvé que le transcrit nouvellement synthétisé était important pour la formation de plasmides hypersurenroulés. Lorsque la RNase HI était incluse dans la réaction, l'hypersurenroulement était complètement aboli. La RNase HI est une endoribonucléase qui dégrade la portion ARN d'un hybride ARN-ADN. La conclusion majeure de cette étude était que l'hypersurenroulement pouvait être le résultat de la formation de R-loops durant la transcription en absence de topoisomérase I. Ainsi, l'accumulation de supertours négatifs derrière le complexe transcriptionnel due à l'absence de topoisomérase I pourrait favoriser l'hybridation de l'ARN avec le brin matrice ADN derrière la polymérase, laissant le brin opposé non apparié et formant cette structure particulière appelée le R-loop. Si la topoisomérase I est incluse dans la réaction, la formation de plasmides hypersurenroulés est abolie.

1.3.2.1. Formation de R-loops *in vitro* en absence de topoisomérase I.

Suite à l'observation que la formation de R-loops peut entraîner l'accumulation de plasmides hypersurenroulés *in vitro*, des études ont été entreprises afin de mieux comprendre le rôle de la topoisomérase I dans la formation de ces structures particulières pendant la transcription de gènes bactériens. L'une des premières séquences testées était une portion de l'opéron *rrnB* de *E. coli* (Phoenix *et al.*, 1997). Les raisons derrière ce choix sont variées. Premièrement, les gènes de l'ARN ribosomal sont fortement transcrits et comptent pour approximativement la moitié de toute activité transcriptionnelle des cellules en phase exponentielle (Gausing, 1980; Condon *et al.*, 1995). De plus, les ARNs ribosomaux ne sont pas traduits. Alors que l'hypersurenroulement lié à *tetA* dépend de la traduction, la présence de ribosomes sur l'ARN inhiberait la formation de R-loops puisque l'ARN impliqué dans un R-loop doit vraisemblablement être nu, du moins dans certaines régions.

C'est dans cette optique qu'un fragment *HindIII* de 567 pb de la région 23S de l'opéron *rrnB* a été cloné sur un plasmide multicopie afin d'étudier les

conséquences de la transcription de ce dernier pour la formation de plasmides hypersurenroulés (Phoenix *et al.*, 1997). Dans ce système, le fragment de l'ARN ribosomal pouvait être transcrit *in vitro* par les ARN polymérases phagiques T3 et T7 dans son orientation physiologique ou dans l'orientation inverse selon le cas. Dans cette étude, il a été montré que la formation de plasmides hypersurenroulés et par conséquent, la formation de R-loops, avait lieu préférentiellement lorsque le fragment de 567 pb était transcrit dans son orientation physiologique. D'ailleurs, la RNase A, une endoribonucléase spécifique à l'ARN simple brin, était complètement inefficace dans l'élimination de l'hypersurenroulement généré lorsque le fragment de *rrnB* était transcrit dans cette orientation, alors que cette dernière pouvait considérablement réduire l'hypersurenroulement dans le cas où le fragment était transcrit dans le sens inverse (Phoenix *et al.*, 1997). Il a été conclu que la stabilité plutôt que la fréquence de la formation des R-loops pouvait être un facteur important dans l'accumulation de plasmides hypersurenroulés. L'influence de l'orientation du fragment transcrit sur la quantité d'hypersurenroulement obtenue peut s'expliquer par le fait que le fragment, dans l'orientation physiologique, génère un ARN plus riche en purines que lorsque transcrit dans l'orientation inverse. Des études antérieures avaient montré que la proportion de purines dans l'ARN dans un hybride ARN-ADN peut influencer la stabilité de ce dernier (Roberts & Crothers, 1992).

Un modèle a été proposé selon lequel la topoisomérase I et la RNase HI sont des régulateurs négatifs de la formation de R-loops, alors que la gyrase favorise leur formation et/ou leur élongation. Une fois formé, le R-loop constitue une structure qui stimule l'activité de relaxation de la topoisomérase I puisqu'il expose une région plus ou moins longue d'ADN simple brin (Phoenix *et al.*, 1997). Selon les résultats de cette étude, il a été suggéré que la topoisomérase I pouvait empêcher la formation de R-loops soit en relaxant les supertours négatifs générés par la transcription, soit en déstabilisant la structure une fois formée.

Plus tard, des études de transcription *in vitro* à l'aide de l'ARN polymérase de *E. coli* ont confirmé que l'hypersurenroulement sensible à la RNase HI pouvait avoir lieu mais que la formation de R-loops dépendait de la transcription en présence de gyrase et que la simple utilisation de plasmides ayant un niveau de surenroulement global plus élevé que celui présenté par les mutants *topA* n'était pas une condition suffisante pour permettre la formation de R-loops et par conséquent, l'hypersurenroulement (Massé & Drolet, 1999a). Le surenroulement négatif très élevé généré durant la transcription semblait donc important pour la formation de R-loops. D'ailleurs, une étude récente a démontré que l'ARN pouvait se réhybrider avec le brin matrice lorsque l'ADN demeurait ouvert dans une région donnée en amont d'un complexe transcriptionnel pour une période prolongée (Daube & Von Hippel, 1994). La sensibilité de l'hypersurenroulement à la RNase A et la RNase HI dans ces conditions a également été évaluée. Contrairement à ce qui avait été observé avec l'ARN polymérase phagique T7, l'hypersurenroulement généré par l'ARN polymérase de *E. coli* était relativement sensible à l'action de la RNase A (Massé & Drolet, 1999a). Ces résultats semblaient indiquer que l'ARN à l'intérieur du R-loop généré lors de la transcription avec les polymérases phagiques n'était jamais déplacé et qu'il pouvait donc possiblement prendre origine dans la bulle de transcription, alors que l'ARN dans un R-loop formé lors de la transcription avec l'ARN polymérase bactérienne était simple brin, du moins dans certaines régions. Une façon alternative d'interpréter ces résultats est basée sur les propriétés des différentes polymérases. Bien qu'elles partagent de nombreuses caractéristiques mécanistiques (Briebe *et al.*, 2001; Mukherjee *et al.*, 2002), l'ARN polymérase de *E. coli* produit beaucoup moins d'ARN *in vitro* que les polymérases phagiques. Il est donc possible que la sensibilité accrue à la RNase A de la polymérase bactérienne soit simplement le résultat d'une plus faible quantité relative d'ARN synthétisé. Il n'est pas possible à ce stade d'exclure l'une ou l'autre de ces possibilités.

1.3.2.2. Formation de R-loops *in vivo* chez les mutants *topA* de *E. coli*.

Parce que les mutants *topA* acquièrent spontanément une ou plusieurs mutations dans les gènes *gyrA* et/ou *gyrB* qui compensent pour la perte de *topA* et qui ont pour conséquence de réduire l'activité de la gyrase (DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982), il était difficile de conclure quoi que ce soit sur les conséquences réelles de la perte de *topA* chez la bactérie. Afin d'améliorer le système pour effectuer des études *in vivo* avec des mutants *topA* de *E. coli*, de nouvelles souches ont été construites avec des mutations compensatoires dans le gène *gyrB* dont le phénotype était exprimé à basse température (Drolet *et al.*, 1995). Ainsi, à 37°C ces mutants *topA* croissent relativement bien puisque la mutation dans *gyrB* permet de réduire l'activité de la gyrase mais au fur et à mesure que la température baisse, la gyrase regagne de l'activité. À 30°C, l'activité de la gyrase atteint des niveaux sauvages. De cette façon, il est possible d'étudier les vraies conséquences de la perte de *topA* en baissant la température d'incubation à 28°C.

La toute première évidence que la formation de R-loops pouvait constituer un problème majeur chez les mutants *topA* a été fournie en 1995 alors qu'on a démontré que la surproduction de 10 à 15 fois de la RNase HI *in vivo* permettait de compléter partiellement la croissance des mutants *topA*, même à 28°C où les phénotypes réels de l'absence de *topA* sont exprimés (Drolet *et al.*, 1995). De plus, les auteurs ont montré qu'un double mutant *topA rnhA* était non viable; le gène *rnhA* étant le gène qui code pour la RNase HI chez *E. coli*. Finalement, cette étude a permis de déterminer que la mutation dans *gyrB* qui compense pour la perte de l'allèle *topA* dans cette souche peut également améliorer la croissance des mutants *rnhA*. Il est donc de plus en plus évident que des liens réels existent entre la topoisomérase I et la RNase HI et que les mutations compensatoires qui surviennent dans les gènes *gyrA* et/ou *gyrB* pourraient contribuer à empêcher ou à réduire la formation de R-loops chez les mutants *topA*. Ces résultats suggèrent donc que les R-loops pourraient être problématiques chez *E. coli* mais ne

permettent pas de conclure quoi que ce soit sur le mécanisme de formation de ces structures, sur les séquences impliquées s'il y a lieu, ni sur les conséquences de la formation des R-loops pour la cellule.

Si l'on considère les propriétés de la transcription des ARNs ribosomaux, il est possible que ces séquences soient propices à la formation de R-loops tel que mentionné plus haut. Pour étudier la question directement, un plasmide portant le fragment *HindIII* de 567 pb de l'opéron *rrnB* décrit précédemment a été employé (Massé *et al.*, 1997). Dans ce système, le fragment dans son orientation physiologique ou inversée était sous contrôle d'un promoteur pouvant être induit par l'ajout d'IPTG. Lorsque ce plasmide était extrait d'un mutant *topA*, la présence de R-loops a été détectée préférentiellement lorsque le fragment était transcrit dans son orientation physiologique. Ce plasmide a également été introduit dans un mutant *topA* qui surproduisait la RNase HI ou qui ne la surproduisait pas. Lors de l'extraction, la présence de R-loops a été détectée préférentiellement lorsque la RNase HI n'était pas surproduite. Ceci confirme que les R-loops sont formés *in vivo* et ne sont pas induits durant l'extraction des plasmides par cette méthode, contrairement à ce qui avait été rapporté précédemment avec d'autres techniques d'isolement de plasmides (Richardson, 1975). Par contre, l'effet RNase HI sur la formation de R-loops *in vivo* est significativement moins spectaculaire que celui observé *in vitro* où la RNase HI réussit à éliminer l'hypersurenroulement. Les auteurs ont attribué cette observation au fait qu'il existe de nombreuses protéines *in vivo* qui pourraient stabiliser l'hypersurenroulement, possiblement en se liant à l'ADN simple brin qui est exposé lorsque le R-loop est formé (Massé *et al.*, 1997).

Dépendant de la méthode d'extraction des plasmides, les R-loops peuvent être mis en évidence soit par retardement de la mobilité des plasmides extraits durant l'électrophorèse en gel d'agarose, soit par l'accumulation de plasmides hypersurenroulés lors de l'électrophorèse en présence de chloroquine. Il est à noter que les plasmides hypersurenroulés dûs aux R-loops n'existent pas *in vivo*.

En réalité, au fur et à mesure que les R-loops sont allongés, les plasmides sur lesquels ils sont formés deviennent progressivement relaxés puisque des supertours sont contraints par le R-loop (Albert *et al.*, 1996). En réponse à cette relaxation, la gyrase introduit des supertours négatifs afin de rétablir un niveau adéquat de surenroulement. Ce n'est qu'au moment de l'extraction où les protéines et l'ARN sont dégradés, que les plasmides hypersurenroulés sont révélés (figure 6, p. 27).

Dans le but d'étudier si la formation de R-loops pouvait avoir lieu pendant la transcription de gènes autres que *rrnB*, le plasmide pBR322 a été modifié afin d'empêcher l'ancrage à la membrane du peptide TetA (Massé & Drolet, 1999b). Ainsi, une délétion en 5' du gène *tetA* enlevant la séquence Shine-Dalgarno, le ATG initiateur et le domaine transmembranaire, mais permettant tout de même la transcription du gène a été effectuée, et la formation de plasmides hypersurenroulés a été évaluée. Ainsi, lorsque le plasmide était extrait d'un mutant *topA* à 28°C, une population de plasmides hypersurenroulés sensible à la RNase HI était clairement présente. En conclusion, la formation de R-loops peut avoir lieu sur des séquences autres que *rrnB* lors de la transcription en absence de topoisomérase I et pBR322 peut générer de l'hypersurenroulement qui dépend de la formation de R-loops plutôt que de l'ancrage à la membrane si la traduction du gène *tetA* est inhibée. Afin de mettre en évidence l'hypersurenroulement dépendant des R-loops avec le plasmide pBR322, il est également possible de faire appel à un inhibiteur de la synthèse protéique (Massé & Drolet, 1999c).

1.3.3. Effet de la température sur la formation de R-loops.

L'utilisation des mutants *topA* décrits plus haut qui portent une mutation compensatoire dans le gène *gyrB* qui permet de moduler les niveaux d'activité de la gyrase en fonction de la température ont permis d'étudier de façon contrôlée les conséquences de la perte de *topA* pour *E. coli*. Parce que la gyrase favorise la

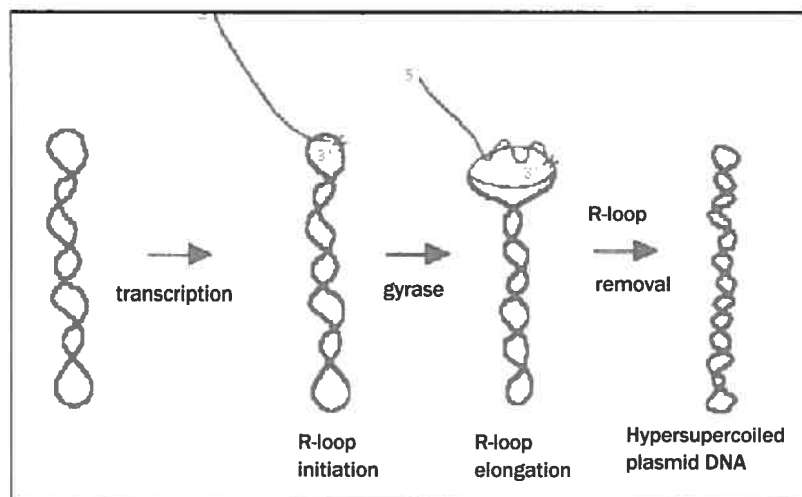


Figure 6. Mécanisme de la formation de l'hypersurenroulement. Si un R-loop est initié pendant la transcription, la gyrase permet son élancement. Au fur et à mesure qu'il est allongé, le R-loop relaxe la molécule d'ADN sur laquelle il se trouve. La gyrase introduit des supertours afin de rétablir un niveau de surenroulement acceptable. Au moment de l'extraction, lorsque les protéines et l'ARN sont dégradés, l'hypersurenroulement est révélé.

formation de R-loops en servant de force motrice permettant leur élancement, il n'était pas surprenant de constater que la quantité de plasmides hypersurenroulés isolée de ces mutants augmentait au fur et à mesure que l'on baissait la température d'incubation jusqu'à 28°C, température à laquelle la gyrase retrouve une activité de niveau sauvage (Drolet *et al.*, 1995). Étrangement, si les cellules étaient exposées à une température de 21°C, la quantité relative de plasmides hypersurenroulés augmentait considérablement par rapport à ce qui était observé à 28°C (Massé & Drolet, 1999a; Massé & Drolet, 1999b). Ceci était surprenant puisque l'activité de la gyrase n'augmente pas entre 28°C et 21°C étant donné qu'elle atteint déjà des niveaux sauvages à 28°C (Drolet *et al.*, 1995). L'augmentation d'hypersurenroulement observée à 21°C n'est donc pas complètement due à l'allèle *gyrB* (Ts) mais semble également liée à la baisse de température comme tel.

Afin d'étudier la question directement, plusieurs mutants *topA* ont été employés dont certains ne présentent aucune mutation thermosensible dans les gènes responsables de l'expression de la gyrase (Massé & Drolet, 1999c). Des plasmides hypersurenroulés ont été isolés de tous les mutants *topA* étudiés, peu importe les mutations compensatoires dans les gènes *gyrA* et/ou *gyrB*. Il est intéressant de noter que les souches *topA* qui possèdent des mutations compensatoires dans les gènes *gyr* dont l'expression n'est pas influencée par la température, la présence de plasmides hypersurenroulés augmente lorsque la température baisse malgré le fait que le surenroulement global chez ces mutants n'est aucunement altéré par la baisse de température (Massé & Drolet, 1999c). Les auteurs de cette étude ont également montré que le gène *rnhA* est nécessaire à la survie de tous les mutants *topA* employés, même ceux qui présentent un niveau de surenroulement global inférieur à celui des cellules sauvages (Massé & Drolet, 1999c). Ceci supporte ce qui avait été observé *in vitro*, soit que le surenroulement local plutôt que le surenroulement global est important pour la formation de R-loops et par conséquent, l'accumulation de plasmides hypersurenroulés.

Les conclusions majeures de cette étude étaient que la formation de R-loops était stimulée à basse température et que ceci corrélait parfaitement avec une inhibition de la croissance des mutants *topA* employés (Massé & Drolet, 1999c). À ce stade, il était de plus en plus évident que la fonction principale de la topoisomérase I chez la bactérie était de prévenir la formation de R-loops qui pouvaient autrement survenir lors de l'élongation de la transcription en absence de celle-ci. Contrairement à ce qui avait été observé à 28°C, la surexpression de la RNase HI à basse température ne complémentait pas la croissance des mutants *topA*. Étrangement, elle avait plutôt un effet négatif sur la croissance de ceux-ci (Massé & Drolet, 1999c). Il a été proposé que la formation de R-loops soit généralisée à basse température et que la dégradation de tous ces ARN entraîne la mort des cellules.

1.4. Rôles biologiques connus des R-loops chez *E. coli*.

Malgré les conséquences parfois redoutables des R-loops pour les mutants *topA*, la formation de ces structures chez la bactérie est parfois favorable, voire nécessaire à la croissance cellulaire. Ces hybrides ARN-ADN jouent un rôle structural dans l'initiation de la réplication du chromosome à *oriC* en favorisant l'ouverture des brins de la double hélice. Les plasmides de type ColE1 dépendent de la formation de R-loops pour être maintenus à l'intérieur d'une cellule hôte et finalement, une forme alternative d'initiation de la réplication appelée le cSDR (« constitutive Stable DNA Replication ») est induite dans certaines conditions chez la bactérie et dépend aussi de la formation de ces structures.

1.4.1. Réplication du chromosome à partir de *oriC*

La région minimale requise pour la réplication du chromosome s'étend sur une région de 245 paires de bases appelée *oriC* à l'intérieur de laquelle se trouvent quatre séquences de 9 pb reconnues par la protéine DnaA et trois séquences riches en A-T de 13 nucléotides (Oka *et al.*, 1980). Le tout premier événement de la réplication implique la liaison coopérative de DnaA aux sites « *dnaA* box » qui permet de dénaturer l'ADN dans la région *oriC* (Fuller & Kornberg, 1983; Fuller *et al.*, 1984; Sekimizu *et al.*, 1987). L'observation que l'initiation de la réplication était sensible à la rifampicine, un antibiotique qui inhibe l'ARN polymérase, laissait croire que cette dernière jouait un rôle important dans les premières étapes de la réplication (Baker & Kornberg, 1988; Ogawa *et al.* 1985). Contrairement à ce que l'on croyait initialement, la transcription n'est aucunement requise pour la production d'amorces mais elle joue plutôt un rôle structural puisque la formation de R-loops, même à distance, peut moduler l'architecture de l'ADN dans la région *oriC* et aider à dénaturer la double hélice pour permettre la formation du complexe de préinitiation de la réplication. L'ADN dénaturé est immédiatement recouvert de molécules SSB (« single- stranded DNA binding protein ») qui empêchent d'une part la

renaturation des brins séparés et d'autre part, la liaison de cet ADN par des protéines qui ne sont pas impliquées dans le processus de réplication.

Il est intéressant de mentionner que la topoisomérase I et la RNase HI qui sont des régulateurs négatifs connus de la formation de R-loops sont également considérés des facteurs de spécificité de l'initiation de la réplication puisqu'elles empêchent la formation de R-loops à des sites aléatoires autres que *oriC* (Ogawa *et al.*, 1984; Kaguni & Kornberg, 1984; Ogawa *et al.*, 1985). Une fois formée, cette association de DnaA avec l'ADN dans *oriC* recrute l'hélicase DnaB. En solution, DnaB est toujours en complexe avec DnaC (Baker *et al.*, 1986; Baker *et al.*, 1987; Funnell *et al.*, 1987). Lorsque DnaB est recrutée à l'origine, DnaC se dissocie aussitôt du complexe. L'hélicase DnaB dénature l'ADN davantage pour permettre la synthèse d'amorces par la primase DnaG (Baker *et al.*, 1987) et l'assemblage de l'holoenzyme ADN polymérase III. La synthèse d'ADN peut ainsi procéder de façon bidirectionnelle et discontinue. L'initiation de la réplication du chromosome requiert la synthèse protéique *de novo*. Ce besoin découle du fait que la protéine DnaA est instable et les réserves doivent être régénérées avant chaque cycle de réplication.

1.4.2. Réplication des plasmides de type ColE1

Le plasmide ColE1 est un plasmide de 6.6 kilobases (kb) à haut nombre de copies. Contrairement à celle du chromosome, l'initiation de la réplication des plasmides ayant une origine de type ColE1 ne requiert pas de synthèse protéique *de novo* (Kornberg & Baker, 1992). La réplication procède de manière unidirectionnelle à partir d'une seule origine de 600 pb (Tomizawa *et al.*, 1974) et dépend entièrement de protéines de la cellule hôte. Trois protéines majeures sont requises afin d'initier la réplication continue *in vitro* sur un plasmide surenroulé négativement, soit l'ARN polymérase, l'ADN polymérase I et la RNase HI (Itoh & Tomizawa, 1980; Itoh & Tomizawa, 1982). *In vivo*, l'initiation de la réplication est sensible à la rifampicine ce qui suggère que la transcription par l'ARN

polymérase est un événement important pour cette dernière (Sakakibara & Tomizawa, 1974a et 1974b).

La première étape de l'initiation de la réplication à l'origine des plasmides de type ColE1 implique la synthèse d'une amorce (RNA II) par l'ARN polymérase à une distance de 555 pb de l'origine (Itoh & Tomizawa, 1980; Tomizawa *et al.*, 1974). Le transcrit RNA II adopte des structures secondaires spécifiques incluant une série de structures en épingle à cheveu et forme spontanément un R-loop dans la région de l'origine (Selzer & Tomizawa, 1982). Ces repliements du transcrit sont importants pour l'action de la RNase HI qui coupe l'hybride afin de le préparer pour la synthèse d'ADN par la polymérase I (Itoh & Tomizawa, 1979). Les amorces qui ne sont pas modifiées par la RNase HI sont peu efficaces pour l'initiation de la réplication et un repliement incorrect du transcrit peut affecter sa maturation par la RNase HI. Suite à une réplication initiale sur une distance approximative de 400 nucléotides, la polymérase I est remplacée par l'ADN polymérase III qui est de loin plus processive que la première (Staudenbauer, 1977).

La réplication discontinue sur le brin opposé a lieu grâce à l'assemblage d'un primosome impliquant les protéines PriA, PriB, DnaT, PriC, DnaB, DnaC et la primase DnaG. L'origine des plasmides de type ColE1 possède une séquence qui peut former une structure en épingle à cheveu appelée le PAS (« Primosome Assembly Site »). Cette structure est reconnue par l'hélicase PriA qui recrute aussitôt PriB, DnaT et PriC (Shlomain & Kornberg, 1980a et 1980b). La protéine PriB semblerait stabiliser le complexe PriA-PAS et faciliterait également la liaison subséquente de DnaT (Low *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1990). La protéine PriC n'est pas absolument requise pour la formation du primosome puisque son absence ne résulte qu'en une réduction de 3 à 4 fois de l'efficacité de formation du complexe (Ng & Marians, 1996a et 1996b). Lorsque DnaT est présente sur le primosome naissant, DnaC y charge l'hélicase DnaB et quitte le complexe.

Ensuite, la primase DnaG et l'ADN polymérase III viennent toutes deux s'associer au primosome pour initier la réplication.

1.4.3. La réplication par cSDR

Chez *E. coli*, la réplication du chromosome est généralement initiée à l'origine *oriC* et la bactérie possède des protéines qui sont considérées des facteurs de spécificité qui empêchent la réplication d'être initiée à des sites aléatoires autres que *oriC*. Tel que mentionné précédemment, ces protéines sont la topoisomérase I et la RNase HI qui sont des régulateurs négatifs de la formation de R-loops (Ogawa *et al.*, 1984; Kaguni & Kornberg, 1984; Ogawa *et al.*, 1985). Dans la fin des années '70 et le début des années '80, des mutants ont été isolés qui pouvaient soutenir la réplication du chromosome de façon stable et constitutive (cSDR : « constitutive Stable DNA Replication »), même en présence d'un antibiotique qui inhibe la synthèse protéique ou encore, lorsque la région *oriC* est délétée (Kogoma, 1978; Kogoma *et al.*, 1981; Kogoma & von Meyenburg, 1983). Ces mutations ont subséquemment été localisées dans le gène *rnhA* qui code pour l'activité RNase HI chez la bactérie (Ogawa *et al.*, 1984). Il a été proposé qu'en absence de RNase HI, des R-loops peuvent être formés à des sites autres que *oriC* et dû au fait que ces structures exposent des régions d'ADN simple brin, elles peuvent servir à assembler une fourche de réplication fonctionnelle.

L'initiation de la réplication par cSDR requiert l'assemblage d'un primosome par les protéines PriA, PriB, PriC, DnaB, DnaC, DnaT et la primase DnaG. Parce que l'hélicase PriA est spécifique aux régions d'ADN simple brin, elle peut initier l'assemblage d'un primosome sur une structure en épingle à cheveu (PAS) aussi bien que sur un substrat d'ADN bifurqué ou ramifié (Liu & Marians, 1999). Le R-loop est une structure qui fait partie de cette famille puisqu'il est formé de jonctions d'ADN double brin et simple brin. Les étapes

subséquentes de la formation du primosome sont identiques à celles décrites pour la réplication discontinue des plasmides de type ColE1.

Deux études publiées en 1984 avaient été entreprises afin de déterminer si des sites étaient préférentiellement utilisés pour initier la réplication par ce mécanisme ou si des R-loops étaient formés à des endroits aléatoires sur le chromosome. Cinq séquences ont été cartographiées et nommées *oriK* pour définir les origines de réplication du cSDR utilisées par les mutants *rnhA* (de Massy *et al.*, 1984a et 1984b). Il est à noter que l'origine *oriC* est toujours fonctionnelle à moins que cette dernière ne soit inactivée soit par délétion, soit en mutant le gène *dnaA*, ou encore en utilisant un inhibiteur de la synthèse protéique.

1.5. Rôles biologiques connus des R-loops chez certains organismes eucaryotes

Puisque que la transcription et la traduction sont naturellement découplées chez les organismes eucaryotes, il n'était pas surprenant de constater que des structures telles que les R-loops pouvaient être formées chez ces cellules. Bien que la fréquence ou les mécanismes de la synthèse des R-loops chez les eucaryotes n'aient pas été évalués à ce jour, il existe vraisemblablement des facteurs qui régulent leur formation de façon positive et/ou négative selon les besoins. Tout comme chez les bactéries, la formation de R-loops chez les organismes eucaryotes peut, dans certaines situations, entraîner des conséquences néfastes pour la croissance, mais ces structures peuvent également jouer d'importants rôles dans divers processus cellulaires.

1.5.1. Réplication de l'ADN mitochondrial

Les mitochondries sont des organelles responsables de la conversion de l'énergie fournie par les nutriments en formes qui peuvent être utilisées par les cellules pour effectuer les réactions enzymatiques (comme l'ATP). Les cellules

animales contiennent en moyenne 100 à 1000 mitochondries chacune (Kornberg & Baker, 1992). Chaque organelle possède plusieurs copies du génome, soit 5 à 10 copies par mitochondrie (Shuster *et al.*, 1988; Weisner *et al.*, 1992). L'ADN des mitochondries est une petite molécule circulaire, leurs ribosomes sont semblables à ceux des bactéries, et leur membrane ressemble d'avantage à celle des organismes procaryotes qu'à celle des cellules dans lesquelles elles résident (Kornberg & Baker, 1992). On a longtemps spéculé sur les origines des mitochondries et dû aux similarités entre celles-ci et les bactéries, il avait été suggéré que ces dernières seraient apparues chez les organismes eucaryotes par une forme de parasitisme où des microorganismes auraient ainsi introduit du matériel génétique et les systèmes pour l'exprimer et le répliquer chez ces cellules (Lang *et al.*, 1999).

Il est intrigant que les mitochondries aient conservé leur propre ADN puisque la plupart des protéines utilisées par ces organelles sont encodées par le génome nucléaire et doivent être importées par ces dernières une fois leur synthèse terminée (Stojanovski *et al.*, 2003). Le génome des mitochondries animales est composé d'ADN circulaire surenroulée négativement d'environ 15 kilobases composé des brins dits H et L. La synthèse du brin H est généralement presque terminée avant que celle du brin L soit déclenchée (Clayton, 1992). De nombreuses études ont permis d'élaborer une cartographie complète du génome et d'identifier la localisation précise de l'origine de réplication (Ojala & Attardi, 1977 et 1978; Brown *et al.*, 1978; Crews *et al.*, 1979). La plupart des molécules d'ADN à l'intérieur des mitochondries animales contiennent un D-loop, une structure semblable au R-loop sauf que le brin non apparié est déplacé par de l'ADN plutôt que de l'ARN. L'ADN mitochondrial est relativement sensible à l'action de la RNase HI (Yang *et al.*, 2002). Cette sensibilité est attribuable au fait que des ribonucléotides sont retrouvés incorporés dans le génome, principalement dans la région de l'origine de réplication (Wong- Staal *et al.*, 1973; Grossman *et al.*, 1973). Les mitochondries animales possèdent des systèmes de réparation des dommages à l'ADN (Pascucci *et al.*, 1997; Karahalil *et al.*, 2003). Par contre, la

réparation des certains dommages causés par une exposition aux rayons ultraviolets (dimères de pyrimidine) ne semble pas aussi efficace dans l'ADN mitochondrial que dans l'ADN nucléaire (LeDoux *et al.*, 1992; Kalinowski *et al.*, 1992; Pascucci *et al.*, 1997).

L'ADN mitochondrial des mammifères code pour les sous- unités 16S et 23S des ribosomes mitochondriaux (ARNr), pour 22 ARN de transfert (ARNt), ainsi que pour un total de 13 protéines (Clayton & Smith, 1975; Clayton, 1984). La transcription chez les mitochondries implique une ARN polymérase qui partage de nombreuses propriétés avec les polymérases phagiques. Cette dernière fait la synthèse de longs ARNs polycistroniques dont la maturation génère les ARNr, ARNt et ARNm de l'organelle (Masters *et al.*, 1987). La transcription sur le brin L du génome permet la synthèse de l'ARN précurseur servant d'amorce pour la synthèse du brin H. Des essais de transcription *in vitro* ont d'ailleurs montré qu'une proportion importante d'ARN synthétisé demeurerait hybridé avec le brin matrice pour former un R-loop (Xu & Clayton, 1996).

La réplication du génome mitochondrial se fait par mode de déplacement de brin de façon relativement asynchrone (Bogenhagen & Clayton 1978a; Bogenhagen & Clayton, 1978b). En d'autres mots, la réplication débute par la synthèse de l'amorce pour la réplication du brin H en utilisant le brin L comme matrice dans la région de l'origine qui contient le D-loop. Un ARN de 500 à 600 nucléotides est transcrit et demeure hybridé avec le brin L, déplaçant le brin H parental au fur et à mesure que l'amorce est allongée, créant ainsi un R-loop (Chang & Clayton, 1987). Le R-loop est par la suite modifié par l'action d'une ribonucléase (RNase MRP chez l'humain), déterminant ainsi le site de transition ARN-ADN sur le brin nouvellement synthétisé. La réplication du brin L dépend de la formation d'une structure en épingle à cheveu sur le brin parental déplacé (qui demeure simple brin) et débute lorsqu'environ 70% du brin H est déjà synthétisé, ce qui permet l'exposition de la région importante pour l'initiation de la réplication sur ce brin (Clayton, 1982). Un extrait mitochondrial qui contient

une primase, l'ADN polymérase γ et la RNase H permet la synthèse du brin L (Wong & Clayton, 1985).

La réplication chez les mitochondries est donc continue et asynchrone. La réplication complète du génome peut prendre jusqu'à une heure à une vitesse approximative de 10 nucléotides par seconde ce qui est relativement lent si l'on compare avec celle des génomes phagiques (100 nucléotides par seconde) ou du génome de *E. coli* (1000 nucléotides à la seconde).

1.5.2. Permutation de classes des immunoglobulines chez les cellules B humaines

Les cellules B sont des cellules extrêmement spécialisées qui produisent les immunoglobulines (ou anticorps) qui protègent les organismes des pathogènes extérieurs. Chaque immunoglobuline reconnaît et interagit avec une structure précise et cette spécificité est tellement étroite que l'organisme en question requiert un vaste répertoire d'immunoglobulines afin de monter une réponse immunitaire adéquate. Les gènes des cellules B qui codent pour ces immunoglobulines doivent subir un processus qui permet d'améliorer le potentiel immunitaire de ces dernières, appelé la permutation de classes (Lieber, 1991; Lieber, 1998). Les immunoglobulines sont formées de deux domaines, l'un dit variable qui reconnaît et qui lie l'antigène auquel il est spécifique, et l'autre qui est constant et qui détermine les propriétés fonctionnelles de l'anticorps. La permutation de classes des immunoglobulines est un événement de recombinaison spécifique à la région intergénique qui sépare les gènes qui codent pour la région constante des immunoglobulines sans toutefois modifier leur spécificité à l'antigène qui a induit leur synthèse (Dunnick *et al.*, 1993; Stavnezer, 1996; Kinoshita & Honjo, 2000). Les régions de permutation précèdent les gènes du domaine constant de chaque classe d'immunoglobuline et sont composées de séquences répétées (Gritzmacher, 1989). Le domaine constant assure une réponse optimale aux différentes formes de pathogènes. Les différentes classes

d'immunoglobulines sont μ , α , γ et ϵ et produisent respectivement les IgM, IgA, IgG et IgE.

Le mécanisme exact du processus de permutation de classes demeure quelque peu obscur mais nous savons qu'il nécessite la transcription. Les ARN synthétisés sont dits « stériles » puisqu'ils ne codent pas pour des protéines connues. La fonction du transcrit dans ce contexte est de former un R-loop, structure qui semble stimuler l'initiation de la recombinaison dans cette région (Yu *et al.*, 2003). Une caractéristique intéressante de ces régions intergéniques est que le brin non-matrice est riche en G-C. Ainsi, la transcription de ces régions génère par conséquent un ARN riche en G-C ce qui contribue à la stabilisation du R-loop, tel que mentionné précédemment (Roberts & Crothers, 1992). La formation des R-loops dans ces régions a été observée il y a quelque temps *in vitro* mais ce n'est que tout récemment que leur existence *in vivo* a été clairement démontrée (Reaban & Griffin, 1990; Reaban *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 2003). La formation des R-loops est donc l'une des toutes premières étapes dans la recombinaison menant à la permutation de classes. Des études récentes ont également identifié la cytidine désaminase comme facteur important dans la réalisation de ce processus (Ramiro *et al.*, 2003). Cette enzyme convertit les cytidines dans l'ADN simple brin en uraciles. La cytidine désaminase agit donc principalement sur le brin non matrice dans la région du R-loop où les bases sont exposées sur une période prolongée. Il semblerait que cette conversion de cytidines en uraciles joue un rôle considérable dans l'initiation de la recombinaison. Il est connu que les bases uracile ne forment pas des liens de type Watson-Crick lorsque présentes dans l'ADN et que ces dernières sont rapidement enlevées par le système de réparation par excision de bases, ce qui génère des sites abasiques dans la chaîne d'ADN (Petersen-Mahrt, *et al.*, 2002; Di Noia & Neuberger, 2002). Ces cassures simple brin doivent par la suite être converties en cassures double brin afin d'initier la recombinaison. Le ou les facteur(s) impliqué(s) dans cette transition n'a (n'ont) toujours pas été identifié(s) mais il est

connu que la synthèse protéique *de novo* est nécessaire pour cette étape de la recombinaison.

Il est évident que la formation de R-loops est parfois requise pour assurer une bonne croissance et dans certains cas, même la survie des cellules. Les facteurs et conditions physiologiques qui régulent la formation ou la prévention des R-loops selon les besoins sont encore peu connus. Par ailleurs, la formation de R-loops pendant la transcription peut parfois se traduire par l'accumulation d'hypersurenroulement chez *E. coli*. L'hypersurenroulement peut également être le résultat de la co- transcription/traduction de gènes dont les produits sont ancrés à la membrane. Cette étude vise à évaluer les facteurs qui influencent la formation de R-loops chez les mutants *topA* nuls de *E. coli* et d'étudier les divers mécanismes de surenroulement de l'ADN induit par la transcription chez cette bactérie.

2. Résultats

« Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressors of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. » par Broccoli, S., Phoenix, P. & Drolet, M. (2000) *Molecular Microbiology*, **35** (1), 58-68.

L'une des fonctions principales de la topoisomérase I chez *Escherichia coli* est d'empêcher la formation de R-loops durant l'élongation de la transcription, sans quoi, ceux-ci pourraient inhiber la croissance cellulaire. Nous avons montré précédemment que les problèmes de croissance des mutants *topA* pouvaient être corrigés par la surproduction de RNase H, une enzyme qui dégrade la partie ARN d'un R-loop. Le but de ce travail était d'identifier d'autres régulateurs de la formation de R-loops. À cette fin, nous avons criblé une banque génomique pour des supresseurs multicopie de mutations *topA*. Ainsi, nous avons isolé le gène *rnhA* qui code pour la RNase H. De plus, nous avons identifié le gène *topB* (topoisomérase III) comme supresseur de mutations *topA*, et donc, de la formation de R-loops. Nous montrons que la topoisomérase III peut relaxer le surenroulement négatif induit par la transcription *in vitro* et *in vivo*, qu'un R-loop est un « hot-spot » de relaxation pour la topoisomérase III et que l'hyper-surenroulement dépendant des R-loops peut être prévenu par la surproduction de la topoisomérase III *in vivo*. Il est également démontré que *topB* peut agir de manière synergique avec *rnhA* afin de corriger les problèmes de croissance des mutants *topA*. Cet effet peut s'expliquer par le fait que certains R-loops ne doivent pas être dégradés afin que l'ARN soit disponible pour la traduction. La topoisomérase III peut vraisemblablement prévenir la formation de R-loops ou en causer la déstabilisation, empêchant ainsi leur dégradation. Ceci est soutenu par le fait que la surproduction de celle-ci corrige l'effet négatif de la surproduction de la RNase H à basse température. De plus, le fait que la topoisomérase III n'affecte aucunement le surenroulement global supporte notre conclusion précédente selon laquelle la formation de R-loops, et par conséquent, la fonction essentielle de la topoisomérase I, implique le surenroulement local plutôt que global. En tant qu'auteur principal de l'article, j'ai contribué 55% des résultats montrés et j'ai activement participé à la rédaction du manuscrit.

Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, C.P.
6128, succursale centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Key words: *Escherichia coli*, DNA topoisomerase I, DNA topoisomerase III, transcription, RNA-DNA hybrid

Summary

One major function of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is to repress R-loop formation during transcription elongation which may otherwise inhibit cell growth. We have previously shown that the growth problems of *topA* mutants can be corrected by overproducing RNase H, an enzyme that degrades the RNA moiety of an R-loop. The goal of the present study was to identify other potential regulators of R-loop formation. To this end, we have screened for multicopy suppressors of *topA* null mutations. As expected by using this procedure, we cloned the *rnhA* gene encoding RNase H. In addition, we also identified the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as an efficient suppressor of *topA* null mutations and hence, of R-loop formation. We show that DNA topoisomerase III is able to relax transcription- induced negative supercoiling both *in vitro* and *in vivo*. An R-loop is also shown to be a hot spot for relaxation by DNA topoisomerase III and we found that R-loop- dependent hypernegative supercoiling can be prevented by the activity of this topoisomerase *in vivo*. It is also shown that the *topB* gene can act synergistically with the *rnhA* gene to efficiently correct the growth defect of *topA* null mutants. This synergistic effect can be explained by the fact that some R-loops must not be degraded in order for the RNA to be available for protein synthesis. Topoisomerase III can presumably repress the formation of such R-loops or cause their destabilization to prevent RNA degradation. This is supported by the fact that overproduction of this topoisomerase corrects the negative effects of overproducing RNase H activity on the growth of *topA* null mutants at low temperatures. Moreover, the fact that DNA topoisomerase III does not relax global supercoiling supports our previous conclusion that R-loop formation, and therefore the essential function of DNA topoisomerase I, involves local, rather than global supercoiling.

Introduction

The *topA* gene of *Escherichia coli* encodes DNA topoisomerase I, a member of the type IA family of these enzymes, also the first DNA topoisomerase to be discovered (Wang, 1971; 1996). Since this topoisomerase binds to the junction of single- stranded with double- stranded DNA regions and since DNA opening is promoted by negative but not positive supercoiling, it specifically relaxes negatively supercoiled DNA (Wang, 1996). Hot- spots for relaxation by this enzyme are provided during transcription elongation because of the generation of a high level of negative supercoiling (the Twin- Domain Model, Liu *et al.*, 1987) and by an R-loop, in which the RNA is hybridized with the template strand leaving the non- template strand unpaired (Phoenix *et al.*, 1997).

Over the last few years, we have accumulated much experimental evidence allowing us to conclude that one major function of DNA topoisomerase I is to inhibit R-loop formation during transcription. We found that the growth defect of *topA* null mutants can be partially corrected by RNase H overproduction, an enzyme which degrades the RNA moiety of an R-loop (Drolet *et al.*, 1995). A correlation was also found between the level of DNA gyrase activity, the enzyme which introduces negative supercoiling within the chromosomal DNA, and the amount of RNase H required to correct the growth of *topA* null mutants. The fact that several *topA* null mutants carry compensatory *gyr* mutations (in *gyrA* or *gyrB*) that reduce DNA gyrase activity and correct their growth problem (DiNardo *et al.*, 1982), was therefore explained by the supercoiling activity of DNA gyrase promoting R-loop formation (Drolet *et al.*, 1995). In contrast, DNA topoisomerase I activity suppresses R-loop formation. The results of *in vitro* experiments very well support this model in which DNA topoisomerases with opposing enzymatic activities regulate the formation of growth-inhibitory R-loops (Drolet *et al.*, 1994; Phoenix *et al.*, 1997; Massé *et al.*, 1997). More recent data has suggested that local supercoiling generated during transcription, rather than global supercoiling that reflects the average superhelical

density of all supercoiling domains, is responsible for R-loop formation and hence, is linked to the essential function of DNA topoisomerase I (Massé and Drolet, 1999a; Massé & Drolet, 1999b).

In order to better understand the mechanism of R-loop formation and its regulation, we sought to isolate multicopy suppressors of *topA* null mutations. To this end, we used an *in vivo* cloning procedure in which the gene of interest is isolated on a replicon with a moderate copy number. By using this system, we were able to isolate the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III. Our results, together with the fact that DNA topoisomerase III has a much higher requirement for single-stranded DNA as compared to DNA topoisomerase I, strongly support our conclusion that R-loop formation and its regulation essentially involves local rather than global supercoiling. Moreover, our results allow us to propose that inhibition of R-loop formation during transcription is not only one, but the major function of DNA topoisomerase I.

Results

Isolation of multicopy suppressors of a topA null mutant

In order to isolate multicopy suppressors of *topA* null mutations, we decided to use an *in vivo* cloning procedure with the mini- Mu derivative pRRA101 (see Experimental procedures). This replicon is made of a mini- Mu- Ap with an origin of replication from the multicopy plasmid ColE1. Although multicopy, the copy number of this vector can be relatively low because of the large size of the recombinant plasmids obtained following the cloning procedure (30- 45 kb). This system should therefore be appropriate for isolating suppressors that are expected to be toxic when overproduced at very high levels. This is often the case with DNA topoisomerases or other enzymes involved in DNA metabolism. Since our initial goal was to isolate additional compensatory mutation(s) from the widely used *topA* null mutant DM800, that carries the *gyrB225* allele (DiNardo *et al.*, 1982; Massé and Drolet, 1999b), a derivative of this strain, EM209 (DM800 *topA*⁺ *gyrB*⁺; Table I) Mu *cts62*, was used as the donor for the genomic DNA. The recipient was the *topA* null RFM480 Mu⁺ strain (Table I, p.64). This strain carries the conditional compensatory mutation *gyrB*(Ts). At 37°C, RFM480 can grow because DNA gyrase activity is sufficiently low to compensate for the absence of *topA*. However, we found that the growth of this strain is still significantly perturbed at this temperature (Drolet *et al.*, 1995). As the temperature decreases, DNA gyrase regains activity and growth becomes much more difficult. We have shown that RNase H overproduction can complement the growth defect of RFM480 at 37°C and below, down to 27°C (Drolet *et al.*, 1995). RFM480 Mu⁺ was thus infected with the *in vivo* constructed genomic bank from EM209 Mu *cts* and the cells were plated on LB media at 37, 28 and 21°C, as described in Material and Methods. The selection procedure is simply based on the colony size. The faster growing positive clones were discarded because they were shown to carry DNA fragments with the wild-type *topA* gene inserted within pRRA101 (data not shown). Several of the remaining clones were further characterized by

using a plaque hybridization procedure with a recombinant λ phage library representing the entire chromosome of *Escherichia coli*, and originally established by Kohara *et al.* (1987; library obtained from Takara Biomedicals, Japan; data not shown). They were also characterized by PCR with appropriate oligonucleotides, by digestions with restriction enzymes and by subcloning. A total of 42 clones were analyzed and identified (Table II, p.65). The cloning of *gyrA* will be the subject of another communication and will therefore not be discussed here. The cloning of the *rnhA* gene by this procedure simply confirms our previous observation that overproduction of RNase H from this gene can partially complement the growth defect of *topA* null mutants (Drolet *et al.*, 1995). The *topB* gene encodes DNA topoisomerase III, the other known member of the type IA family of topoisomerases present in *Escherichia coli* (Wang, 1996). The *topB* gene was subcloned from a recombinant pRRA101 clone as a ~8.5 kb *Pst*I DNA fragment, within the pSC101-based low copy vector pAD400, to give pPH1095. The fact that the insertion of a kanamycin resistance cartridge within the unique *Bgl*III site of the *topB* gene (DiGate and Marians, 1989) abolished the complementation of the growth defect of RFM480 by this ~8.5 kb *Pst*I DNA fragment, confirmed that the suppression conferred by pPH1095 is due to the presence of an active *topB* gene (data not shown). We found that the *topB* gene cloned by PCR with *Pfu* DNA polymerase (Stratagene) from either *topA* null or wild- type strains was able to similarly complement the growth defect of RFM480. These results indicate that a wild- type *topB* gene but not a mutated one, is responsible for the observed suppression.

Suppression of the growth defect of topA null mutants by overproduction of topoisomerase III

The next series of experiments was performed to determine to what level the *topB* gene was able to suppress the growth defect of *topA* null mutants, and to compare this suppression with the one conferred by the *rnhA* gene. We performed the complementation studies with two *topA* null mutants, RFM475 and RFM480

(Table I, p. 64). The strain RFM475 is identical to RFM480 but carries the $\Delta(topA\ cysB)204$ allele instead of the *topA20::Tn10* allele of RFM480. Only the results of the complementation studies with RFM475 are presented here. The studies with RFM480 gave similar results (data not shown). The plasmid pPH1095 was used as the source of the *topB* gene. In this construct the *topB* gene included within a ~8.5 kb *Pst*I chromosomal DNA fragment, is carried on a replicon that is maintained at 6 to 8 copies per chromosome equivalent (Stoker *et al.*, 1982). Therefore, a bacterial cell carrying pPH1095 is not expected to overproduce topoisomerase III by more than 5- to 10- fold. In our hands, this plasmid construct gave us the best results for the suppression of the growth defect of *topA* null mutants. When the *topB* gene was optimally placed under the control of the strong IPTG- inducible *P_{trc}* promoter and a very good Shine- Dalgarno sequence, we found it to be toxic for wild- type cells even in the absence of the inducer. This construct was able to complement the growth defect of *topA* null mutants, but was toxic when the IPTG concentration exceeded 50 μ M (data not shown). The detrimental effect of increased amount of TopB protein on cell growth has been previously observed (DiGate and Mariani, 1989). We therefore have to consider the possibility that this excessive toxicity of TopB overproduction on cell growth could partially mask its real capacity to suppress various phenotypes of *topA* null mutants. A *topA* null mutant carrying pEM001, a plasmid bearing the *rnhA* gene that was used in our studies, overproduces RNase H activity by roughly 10- to 15- fold (data not shown and Drolet *et al.*, 1995).

We first tested the capability of pPH1095 to stimulate the growth of RFM475 on solid LB media at various temperatures (Figure 1a, p. 67). A RFM475 strain carrying pEM003 (*rnhA*⁻) was used as the negative control (left panels). It can be seen that *topB* alone, *rnhA* alone and a combination of *topB* and *rnhA*, roughly stimulate the growth to the same extent at 37°C (top panels). The same is also apparently true for RFM475 cells exposed to 28°C (middle panels), a restrictive temperature for the growth of this strain (see RFM475/pEM003, 28°C and Drolet *et al.*, 1995). However, a shorter incubation period reveals that *rnhA* is

slightly better than *topB* at this temperature and that a combination of both genes confers a synergistic effect on the growth (Figure 1b, p. 67). Such an effect of the combination of *rnhA* and *topB* is also revealed and is indeed more apparent at 21⁰C (Figure 1a, bottom panels; p. 67). Note that, as shown before, RNase H overproduction did not stimulate the growth of RFM475 at 21⁰C (Figure 1a, p. 67 and Drolet *et al.*, 1995). In fact, we have recently found that RNase H overproduction could be inhibitory for *topA* null mutants at this temperature (E. Massé and M. Drolet, submitted and see below). However, overproduction of topoisomerase III stimulates the growth of RFM475 at this temperature (Figure 1a, p. 67). Growth at 28⁰C in liquid media reveals that the multicopy suppressors alone, or in combination, act by shortening the lag phase of growth (Figure 2, p. 68). Therefore, the multicopy suppressors act by allowing the strain to more rapidly adapt to fresh media. Such a stimulation by RNase H overproduction was previously observed (Drolet *et al.*, 1995; E. Massé and M. Drolet, submitted). In addition, it can be seen that a combination of both multicopy suppressors improves the growth during the exponential phase. We next quantitatively evaluated the capability of the various suppressors to confer independently, or in combination, the ability for RFM475 to form colonies at lower temperatures. As can be seen in Table III on p. 69, only *topB* or a combination of *topB* and *rnhA* almost fully restored the ability of RFM475 to form colonies at all temperatures tested. In conclusion, although *topB*, but not *rnhA*, can restore the viability of *topA* null mutants at all temperatures tested, when *rnhA* has a positive effect, it is better than *topB*. This is possibly due to the fact that the stimulatory effect of RNase H overproduction during the exponential phase of growth is slightly stronger than the one conferred by topoisomerase III overproduction (Figure 2, p. 68). The synergistic effect of a combination of *topB* and *rnhA* is further addressed in another section.

DNA topoisomerase III is able to relax transcription- induced negative supercoiling both in vitro and in vivo

The currently available data strongly suggest that DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription- induced negative supercoiling (Massé and Drolet, 1999ab) and/or by acting as soon as the R-loop is initiated to destabilize it (Phoenix *et al.*, 1997). Therefore, the inhibitory action of DNA topoisomerase I on R-loop formation does not seem to involve global supercoiling. The fact that DNA topoisomerase III can partially suppress the growth defect of *topA* null mutants seems to support this hypothesis, because this topoisomerase does not efficiently relax negatively supercoiled DNA with a wild-type superhelical density. Relaxation of such negatively supercoiled DNA is best observed when the *in vitro* reaction is performed at 52°C, a temperature that provides the substrate without inactivating the enzyme (DiGate and Mariani, 1988). This is because DNA topoisomerase III has a very high requirement, higher than that of DNA topoisomerase I, for single- stranded DNA for its activity. Indeed, such a substrate could be generated during transcription elongation because of the formation of high levels of negative supercoiling that favors DNA opening, and is provided by an R-loop. In this context, suppression of the growth defect of *topA* null mutants by overproducing topoisomerase III would be logical, and would further support our hypothesis that global supercoiling is not involved in R-loop formation, nor in the essential function of DNA topoisomerase I. We therefore tested the activity of DNA topoisomerase III on different substrates, both *in vitro* and *in vivo*, that could illustrate the function of *topA* in R-loop formation.

We initially evaluated the activity of DNA topoisomerase III on an actively transcribed DNA template. To this end, we first used the *in vitro* transcription assay developed by Tsao *et al.* (1989) to support the Twin- Domain model for transcription. In this assay, a relaxed DNA template is shown to be positively supercoiled during transcription in the presence of *E. coli* DNA topoisomerase I,

which specifically relaxes transcription- induced negative supercoiling. Indeed, results presented in Figure 3 (p. 70) show that a relaxed DNA template becomes positively supercoiled during transcription in the presence of DNA topoisomerase I (lanes 2 to 4). DNA topoisomerase III is also shown to relax transcription-induced negative supercoiling, albeit less efficiently than DNA topoisomerase I, since positively supercoiled DNA is also produced during transcription in the presence of this DNA topoisomerase (lanes 5 to 7).

We next tested the capability of DNA topoisomerase III to relax transcription-induced negative supercoiling *in vivo*. Our assay makes use of the *tetA* gene on pACYC184 DNA. Transcription of this gene has been shown to generate very high levels of negative and positive supercoiling (Pruss and Drlica, 1986; Wu *et al.*, 1988). This is due to the anchorage of the TetA protein to the membrane during coupled transcription- translation, that results in the complete inhibition of RNA polymerase rotation (Lynch and Wang, 1993). Under such conditions, hypernegatively supercoiled plasmid DNA has been shown to be generated in the absence of DNA topoisomerase I, since only the positive supercoils are then relaxed (by DNA gyrase). Therefore, if DNA topoisomerase III is also able to relax transcription- induced negative supercoiling *in vivo*, it should repress or at least reduce the formation of hypernegatively supercoiled pACYC184 DNA in *topA* null mutants. To test this, RFM480 cells carrying pACYC184 were transformed with the plasmid pPH1243. In this construct, the entire *topB* gene with a portion of its 5' non-coding region including a poor Shine- Dalgarno sequence, was cloned under the control of the IPTG- inducible promoter *P_{trc}* and a good Shine- Dalgarno sequence (see Material and Methods). Such a plasmid construct is a poor TopB producer as shown by the fact that good complementation of *topA* null mutants is observed when IPTG is added at 0.3 mM and over, also a condition that does not significantly impair the growth of wild-type cells (data not shown). This plasmid is therefore suitable for our studies. It can be seen that overproduction of topoisomerase III in RFM480 significantly reduces the production of transcription- induced highly negatively supercoiled

pACYC184 DNA at 37°C (Figure 4, p. 71; compare lane 1, -IPTG with lane 2, +IPTG). At 28°C, overproduction of DNA topoisomerase III at the level achievable with pPH1243, only slightly reduces the formation of such plasmid topoisomers (compare lane 3, -IPTG with lane 4, +IPTG). Under these conditions, DNA gyrase is more active in RFM480 as compared with the situation at 37°C, because of the presence of the *gyrB*(Ts) allele (Drolet *et al.*, 1995). Together, our results show that DNA topoisomerase III is able to relax transcription- induced negative supercoiling both *in vitro* and *in vivo*.

DNA topoisomerase III can inhibit R-loop formation both in vitro and in vivo

One alternative way to inhibit extensive R-loop formation and therefore to avoid RNA degradation by RNase H, is to use the R-loop as a substrate for DNA relaxation by a topoisomerase. An R-loop was indeed shown to be a hot- spot for DNA relaxation by *E. coli* topoisomerase I (Phoenix *et al.*, 1997). Upon relaxation of the DNA template by a topoisomerase, the initiated R-loop cannot be further elongated, and the RNA-DNA hybrid is eventually unwound because of its instability due to its very short length. We therefore tested if an R- looped DNA template can be a hot spot for relaxation by DNA topoisomerase III in an *in vitro* system. Results presented in Figure 5 (p. 72) show that it is the case. Indeed, it can be seen that DNA topoisomerase III efficiently relaxes an R- looped DNA substrate (lanes 5 to 8). It can also be noted that DNA topoisomerase III is better than DNA topoisomerase I in relaxing an R- looped DNA substrate (compare lanes 1 to 4, DNA topoisomerase I and lanes 5 to 8, DNA topoisomerase III). Since the reaction buffers for this assay and the one described in Figure 3 (p. 70) are identical, we can conclude that an R- looped DNA template is relatively a better substrate for DNA topoisomerase III than DNA topoisomerase I, whereas the reverse situation is true for a transcribed DNA template. This fits well with the known substrate requirement of the two enzymes, considering the fact that the opened DNA region is more stable in an R-loop than it is during transcription elongation, where such a region is only transiently generated. Also note that

when an R- looped DNA substrate is first treated with RNase H to remove the R-loop, DNA topoisomerase III does not relax the DNA template at all (lanes 13 to 15). This confirms the previous finding that a negatively supercoiled template with a wild- type superhelical density is a poor substrate for relaxation by this topoisomerase (DiGate and Mariani, 1988).

Our next series of experiments was performed to directly evaluate the ability of DNA topoisomerase III to inhibit extensive R-loop formation *in vivo*. The assay, once again, is based on the use of the *tetA* gene. We have recently shown that transcription of this gene can lead to R-loop formation in *topA* null mutants when *tetA* mRNA is not translated (Massé and Drolet, 1999b). This was accomplished by either deleting the ribosome binding site and the 5' portion of the coding region of *tetA* (pBR322 Δ *tet5'* and pACYC184 Δ *tet5'*), or by exposing cells carrying pBR322 to the protein synthesis inhibitor, spectinomycin. For example, overproduction of RNase H was shown to abolish the formation of hypernegatively supercoiled pBR322 Δ *tet5'* in *topA* null mutants (Massé and Drolet, 1999b). Results presented here show that DNA topoisomerase III can abolish the formation of such topoisomers of this plasmid, and is therefore able to inhibit R-loop formation *in vivo* (Figure 6, p. 73). Indeed, it can be seen that hypernegatively supercoiled pBR322 Δ *tet5'* is barely detectable when DNA is extracted from RFM480 cells overproducing topoisomerase III (compare lanes 13 to 15, 26°C, +pAD400 and lanes 16 to 18, 26°C, +pPH1095). The results presented in Figure 6 (p.73) also clearly demonstrate that overproducing DNA topoisomerase III in a *topA* null mutant does not change the global supercoiling level. As expected, this shows that topoisomerase III does not complement the growth defect of *topA* null mutants, and therefore does not inhibit R-loop formation, by altering the global supercoiling level.

RNase H and DNA topoisomerase III act synergistically to suppress R-loop formation

Our results show that both DNA topoisomerase I (Phoenix *et al.*, 1997) and III (see above) can prevent the degradation of RNA within the R-loop. This is accomplished by either inhibiting R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling, or by using the R-loop as a hot spot for DNA relaxation, thus destabilizing the short initiated RNA-DNA hybrid. This is expected to be important if the RNA within the hybrid is infrequently synthesized and must be used for protein synthesis. Under such conditions RNA degradation by RNase H is expected to be detrimental to cell growth. However, since RNase H overproduction can sometimes rescue the growth defect of *topA* null mutants, the RNA in the R-loop can occasionally be degraded. This seems to be the case for the heavily transcribed *rrn* operons encoding ribosomal RNAs (rRNAs). Indeed, we have previously shown that R-loop formation can occur during *rrn* transcription in *topA* null mutants (Massé *et al.*, 1997), and we recently found that RNase H overproduction in the absence of DNA topoisomerase I facilitates rRNA synthesis (C. Hraiky, J. Demers and M. Drolet, unpublished). However, RNase H overproduction was recently shown to be detrimental for the growth of *topA* null mutants at low temperatures, conditions that were also shown to favor R-loop formation (E. Massé and M. Drolet, submitted). Presumably, under such conditions, some RNAs must not be degraded by RNase H in order to be available for protein synthesis. Therefore, at low temperatures, overproduction of topoisomerase III could compete with RNase H to inhibit R-loop formation or to destabilize occurring R-loops, in order to avoid the unwanted RNA degradation by RNase H. To test this hypothesis, we used the *topA* null mutant DM800 that has been extensively studied genetically and at the level of DNA supercoiling (DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982; E. Massé and M. Drolet, submitted). We have recently found that RNase H overproduction reduces the growth of DM800 at 21°C (E. Massé and M. Drolet, manuscript submitted for publication and Figure 7, p. 74; compare DM800/pSK762c and DM800 pSK760). Results presented in

Figure 7 (p. 74) show that overproduction of DNA topoisomerase III slightly improves the growth of DM800 at 21°C (compare DM800/pPH1095 or DM800/pPH1095+pSK762c and DM800/pSK762c). We also found that overproduction of topoisomerase III significantly stimulates the growth of a *gyrB*⁺ derivative of DM800 at 37, 28 and 21°C (data not shown). It can also be seen that topoisomerase III overproduction almost completely abolishes the negative effect of overexpressing RNase H activity (Fig. 7, p. 74; compare DM800/pPH1095+pSK760 and DM800/pSK760). This opposite effect of topoisomerase III and RNase H is also observed, but to a lesser extent, when DM800 cells are incubated at 28°C, but is not observed when these cells are exposed to 37°C (data not shown). These results perfectly support our hypothesis that DNA topoisomerase III can sometimes act by competing with RNase H to avoid the undesired degradation of some RNAs. Similar observations are also made when these studies are performed with other *topA* null mutants (data not shown). In RFM480 and RFM475 cells, once the negative effect of overproducing RNase H is counteracted by overexpressing topoisomerase III activity, the synergistic effect of both suppressors is revealed. This could be explained by the fact that the negative effect (the degradation of some mRNAs) of overproducing RNase H alone masks its positive effect (possibly at the level of rRNA synthesis). When the amount of topoisomerase III is high enough, the degradation of some RNAs by RNase H is prevented and the positive effect of overproducing this enzyme can be observed. We have recently shown that overproduction of RNase H makes a *gyrB*⁺ derivative of DM800 reach the stationary phase of growth sooner than normal (E. Massé and M. Drolet, manuscript submitted for publication). We found that overproducing topoisomerase III also abolishes this negative effect of increased cellular RNase H activity (data not shown).

Discussion

The work presented in this study was initiated in the aim of characterizing proteins, other than DNA topoisomerase I and RNase H, which could negatively regulate R-loop formation. The selection procedure was based on the numerous observations indicating that a major problem of *topA* null mutants is R-loop formation (Drolet *et al.*, 1995; Massé *et al.*, 1997; Massé and Drolet, 1999a; E. Massé and M. Drolet, submitted). At the same time, these studies could reveal additional functions of DNA topoisomerase I, or simply strengthen our conclusion about the involvement of this enzyme in the regulation of R-loop formation. In addition to DNA topoisomerase I and RNase H, DNA topoisomerase III was the only other protein identified as a multicopy suppressor by our screening procedure. Note that proteins encoded by genes that are part of very large operons could have escaped this screening system. The same is also true for proteins that are active within multi-subunit enzymes, encoded by genes too far apart on the chromosome to be isolated on a single DNA fragment. This is possibly the case for DNA topoisomerase IV that is made up of two subunits, encoded by *parC* and *parE*. Based on genetics evidence, this enzyme was previously suggested to be able to complement the growth defect of *topA* null mutants when overproduced (Raji *et al.*, 1985; Dorman *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1990; Free and Dorman, 1994; Drolet *et al.*, 1995; McNairn *et al.*, 1995).

Together, the results of our *in vitro* and *in vivo* experiments conducted with topoisomerase III and the positive effect that overproducing this enzyme can have on the growth of cells overexpressing RNase H activity, allow us to propose that the regulation of R-loop formation is not only one, but the major function of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. This could not be concluded before, because RNase H overproduction was shown to be incapable of complementing the growth defect of *topA* null mutants at low temperatures (Drolet *et al.*, 1995; E. Massé and M. Drolet, submitted). Our conclusion is also supported by the results of marker exclusion experiments conducted with a *topA* null allele and a co-

transducible nearby marker, as previously performed (Drolet *et al.*, 1995). The results of such experiments indicate that the *topA* null allele is co-transducible with the nearby marker in wild-type cells overproducing both RNase H and topoisomerase III. The frequency of co-transduction is at least as high as it is when the recipient carries a good and well characterized compensatory *gyr* mutation, such as the one present in DM800 (data not shown). However, the resulting strains do not grow as well as wild-type cells or *topA* null mutants that carry *gyr* mutations reducing the global supercoiling level. This could be due to the fact that it is not possible to produce sufficient amounts of TopB proteins or, alternatively, that the global supercoiling level within these strains is too high for optimal growth, as previously suggested to explain the growth deficiency of *topA* null mutants (Drlica, 1992).

Our results also suggest that DNA topoisomerase I is the best protein to deal with R-loop formation, possibly because it can best prevent their formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. We may also have to consider the possibility that DNA topoisomerase I is the best protein to perform this task, because it physically interacts with RNA polymerase. To our knowledge, this has never been directly tested. Interestingly, in a recent study aimed at understanding the relationship between Tn5 transposase and DNA topoisomerase I, results were obtained that suggested a direct interaction between DNA topoisomerase I and RNA polymerase (Yigit and Reznikoff, 1999). However, according to the available data, DNA topoisomerase I does not have to interact with RNA polymerase to perform its task. In their studies, Yigit and Reznikoff (1998; 1999) reported that the lethal effect of overproducing Tn5 transposase (Weinreich *et al.*, 1994) was due to titration of topoisomerase I. Filamentation, aberrant nucleoid segregation and anucleated cell formation (Weinreich *et al.*, 1994; Yigit and Reznikoff, 1997) were shown to accompany this lethal effect of Tn5 transposase overproduction, suggesting the involvement of topoisomerase I in chromosomal DNA segregation (Yigit and Reznikoff, 1998). However, as mentioned by the authors of these studies, topoisomerase I is

incapable of catalyzing decatenation *in vitro* (Hiasa *et al.*, 1994; Wang, 1996). We have recently observed extensive filamentation of *topA* null mutants exposed to 21°C when RNase H was overproduced (S. Broccoli, E. Massé and M. Drolet, unpublished). It is therefore possible that the effects of DNA topoisomerase I on chromosomal DNA segregation and cell division are indirect and mediated through R-loop formation. Overproduction of topoisomerase III was also found to counteract this effect of RNase H overproduction. Whether topoisomerase III acts by inhibiting R-loop formation or via its decatenation activity in replication (Hiasa *et al.*, 1994) remains to be seen. However, it is important to mention that there is no experimental evidence for a role of DNA topoisomerase III in chromosomal DNA segregation *in vivo*.

Our results also show that DNA topoisomerase III can, at least occasionally, behave as a classical DNA topoisomerase and therefore relax DNA. This can occur, of course, if its substrate (single- strand DNA) is provided. Although our results are more consistent with a direct involvement of DNA topoisomerase III in inhibiting R-loop formation to suppress the growth defect of *topA* null mutants, for the moment we can not completely rule out the possibility that this effect is indirect. Indeed, it is possible that DNA topoisomerase III overproduction affects the expression of a gene encoding a protein that can regulate R-loop formation. However, since DNA topoisomerase III is a very low abundant protein (1- 10 copies per cell; DiGate and Marians, 1988), we do not think that its normal function is related to transcription, which is the most frequent genetic event. Moreover, we believe that the results presented in this study reveal the function of DNA topoisomerase I, but do not address the function(s) of DNA topoisomerase III. Since it is a low abundant protein and that an R-loop can be a hot- spot for this enzyme, we have to consider the possibility that some phenotypes of *topA* null mutants are due to a depletion of TopB proteins. Such a situation will create phenotypes that should be attributed to a reduced level of DNA topoisomerase III and not to the absence of DNA topoisomerase I. Clearly, additional studies are

required to solve this problem and to more clearly delineate the functions of the two type IA DNA topoisomerases in *Escherichia coli*.

Experimental procedures

E. coli strains

The *E. coli* strains used are listed and described in Table I, p. 64.

Plasmids

pPH1095 (Tc^R, Km^R) was constructed by subcloning a ~8.5 kb *Pst*I DNA fragment from a pRRA101 recombinant clone that complemented the growth defect of RFM480, within pAD400 (Tc^R, Km^R), a pSC105- based cloning vector. pAD400 (a gift from Dr. G. Drapeau, Université de Montréal) was obtained by inserting the multiple cloning site of pUC18 within the *Pvu*II site of pLG339 (Stoker *et al.*, 1982). pPH1243 (Ap^R) is a pTrc99a (Amersham Pharmacia Biotech)- derivative in which a PCR-derived DNA fragment including the *topB* gene was inserted downstream of the IPTG-inducible *P**trc* promoter. This vector also carries the *lacI*^q gene. The 5' end oligonucleotide used for PCR, that also includes an *Eco*RI recognition site, (dCTAGGAATTCCTGAACGTAACCTTGC) has its 3' end situated 213 nucleotides upstream of the ATG initiation codon of *topB*. A PCR fragment obtained by also using a 3' end oligonucleotide that includes a *Bam*HI recognition sequence (dTCGAGGATCCAGCACGAAAGATTAC), was digested with *Eco*RI and *Bam*HI and inserted within a pTrc99a vector previously digested with the same restriction enzymes. The resulting plasmid, pPH1243, carries the *topB* gene with its poor Shine- Dalgarno and roughly 200 nucleotides of its 5' end inserted downstream of *P**trc* and a good Shine- Dalgarno sequence. This plasmid construct is presumably a poor TopB producer has shown by its low toxicity and by the high amount of IPTG required to complement the growth defect of *topA* null mutants (data not shown and see Results). pBR322Δ*tet*5' (Ap^R) is a pBR322 derivative in which the 5' portion of the *tetA* gene, including the ribosome binding site and the 5' portion of TetA has been removed by an *Eco*RV-*Hind*III deletion

(Massé and Drolet, 1999b). A new -10 sequence for the *tetA* promoter was created as a result of this deletion. pSK760 (Ap^R) and pSK762c (Ap^R) are pBR322 derivatives that, respectively, carry the wild-type *rnhA* gene or a mutated and inactive version of this gene (Drolet *et al.*, 1995). pEM001 (Cm^R) and pEM003 (Cm^R) are pACYC184 derivatives that are, respectively, the equivalent of pSK760 and pSK762c (Massé *et al.*, 1997). pJP459 (Ap^R) is a pBluescript II KS derivative in which the 567 base pair *HindIII* DNA fragment from the *rrnB* operon was inserted in the physiological orientation relative to the vector map numbering (Massé *et al.*, 1997).

Media and Growth conditions

Unless otherwise indicated, bacteria were grown in LB medium supplemented with cysteine (50 µg/ml) at the temperature indicated in the table and figure legends. When needed, antibiotics were added as follows: ampicillin and kanamycin at 50 µg/ml, chloramphenicol at 30 µg/ml and tetracycline at 10 µg/ml. Because of the *acrA13* mutation in the DM800 derivatives that renders these cells more permeable to many antibiotics (DiNardo *et al.*, 1982), chloramphenicol and kanamycin were respectively used at 10 and 15 µg/ml for these cells.

In vivo cloning

The detailed procedure for the use of the pRRA101 vector (Tc^R, Ap^R, Km^R) for *in vivo* cloning, together with its restriction map, has been published in Noël and Drapeau (1986). In the present work, the strain EM209 (DM800 *topA*⁺, *gyrB*⁺) lysogenic for Mu *cts62* was used to construct the *in vivo* genomic bank. We had to use a *topA*⁺, *gyrB*⁺ derivative of DM800 since our attempts to infect DM800 with Mu *cts62* proven unsuccessful. At the same time, the use of a *gyrB*⁺ derivative eliminated the possibility of isolating the *gyrB225* allele of DM800 as a multicopy suppressor of RFM480.

DNA supercoiling analysis

For the extraction of plasmid DNAs for supercoiling analysis, the procedure described in Massé and Drolet (1999b) was used except that the bacterial cells were grown overnight in LB medium instead of VB Casa medium. Briefly, cells grown overnight were diluted 1/75 in pre-warmed LB medium supplemented with the appropriate antibiotics. The cells were grown to an OD₆₀₀ of 0.4 at 37°C at which time they were split and transferred to the desired temperatures. The plasmid DNAs were extracted when the OD₆₀₀ reached about 0.7 or after an exposition of about 1 hour at the respective temperature, when an OD₆₀₀ of 0.7 could not be reached. Growth was stopped by transferring the cells in a tube filled with ice. By this procedure, the temperature of the cultures immediately dropped to 0°C. Plasmid DNAs were extracted by an alkaline lysis procedure.

Electrophoresis in the presence of chloroquine

One-dimensional agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine in 0.5 X TBE was performed essentially as described (Phoenix *et al.*, 1997). After electrophoresis, agarose gels were dried and prepared for *in situ* hybridization as previously described or stained with ethidium bromide and photographed under UV light (Phoenix *et al.*, 1997).

In vitro transcription assays

In vitro transcription reactions to assay the relaxation activity of DNA topoisomerases during transcription with phage T3 RNA polymerase (from Life Technologies) were performed as described in Tsao *et al.* (1989). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I and III were provided, respectively, by Dr. Leroy F. Liu (UMDNJ, Robert Wood Johnson Medical School) and Dr. Russell J. DiGate (University of Maryland at Baltimore). The preparation of R- looped DNA templates and their relaxation by DNA topoisomerases were performed exactly as

Technologies) were performed as described in Tsao *et al.* (1989). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I and III were provided, respectively, by Dr. Leroy F. Liu (UMDNJ, Robert Wood Johnson Medical School) and Dr. Russell J. DiGate (University of Maryland at Baltimore). The preparation of R- looped DNA templates and their relaxation by DNA topoisomerases were performed exactly as described in Phoenix *et al.* (1997). pJP459 DNA purified by using the Qiagen plasmid kit (Qiagen) was used in the *in vitro* transcription reactions. When required, relaxed pJP459 template was prepared by using human DNA topoisomerase I (obtained from Dr. Leroy F. Liu, UMDNJ, Robert Wood Johnson Medical School).

Current Molecular Biology Techniques

The current molecular biology techniques were performed essentially as described (Sambrook *et al.*, 1989). CaCl_2 transformations were carried out as described (Drolet *et al.*, 1995).

Acknowledgements

We thank Dr. Gabriel Drapeau (Université de Montréal) for the gift of bacterial strains and plasmids and for his help with the use of the *in vivo* cloning system. We also thank Dr. Russell J. DiGate (University of Maryland at Baltimore) for purified *Escherichia coli* DNA topoisomerase III and Dr. Leroy F. Liu (UMDNJ, Robert Wood Johnson Medical School) for purified *Escherichia coli* and human DNA topoisomerase I. The excellent technical assistance from Eric Massé is also acknowledged. This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (MT-12667) to M.D. M.D. is a recipient of a scholarship from Les Fonds de la recherche en santé du Québec.

Table I. Bacterial strains used in this study

Strain	Genotype	Reference
DM800	$\Delta(topA\ cysB)204$, <i>gyrB225</i> , <i>acrA13</i>	DiNardo <i>et al.</i> (1982)
EM209	DM800 <i>topA</i> ⁺ , <i>cysB</i> ⁺ , <i>gyrB</i> ⁺	Massé <i>et al.</i> (1997)
RFM475	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , $\Delta lac74$, <i>gyrB221</i> (Cou ^R), <i>gyrB203</i> (Ts), $\Delta(topA\ cysB)204$	Drolet <i>et al.</i> (1995)
RFM480	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , $\Delta lac74$, <i>gyrB221</i> (Cou ^R), <i>gyrB203</i> (Ts), <i>topA20::Tn10</i>	Drolet <i>et al.</i> (1995)

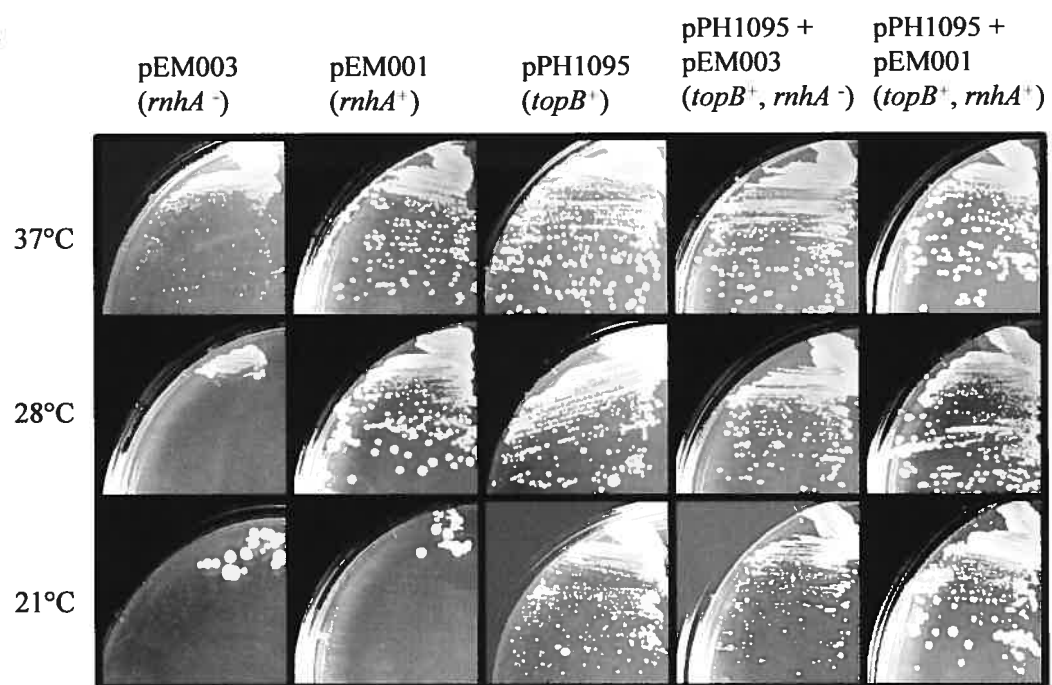
Table II. Multicopy suppressors of the *topA* null mutant RFM480 isolated at different temperatures.

Multicopy suppressor	Number of clones		
	37°C	28°C	21°C
<i>topB</i>	9	0	0
<i>rnhA</i>	0	1	0
<i>gyrA</i>	7	4	21

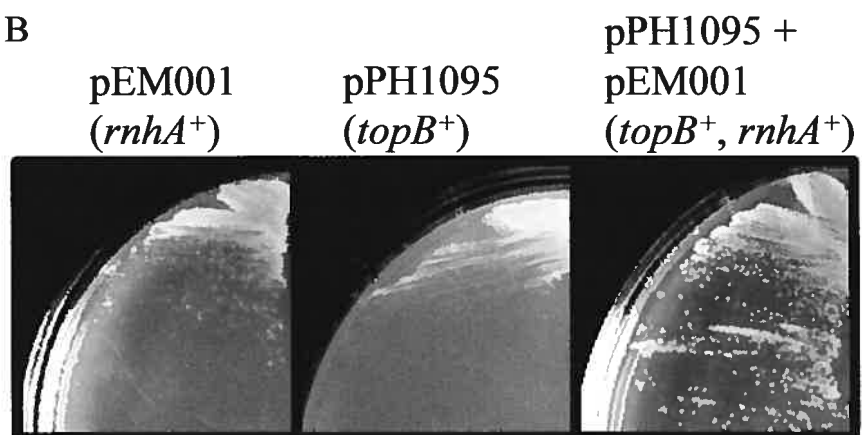
The clones were isolated on LB plates as indicated in Experimental procedures after a period of incubation of 2, 4 and 6 days, respectively at 37, 28 and 21°C.

Fig. 1. Complementation of the growth defect of a *topA* null mutant by topoisomerase III overproduction at different temperatures, on solid LB media. RFM475 cells carrying the indicated plasmid DNAs were first streaked for single colonies at 37°C on LB media supplemented with the appropriate antibiotics. Four colonies of each RFM475 transformant were then resuspended in 50 µl of LB medium, and 2 µl of this bacterial suspension were streaked for single colonies on LB media. In A, incubations at 37, 28 and 21°C were respectively for 18 hrs, 42 hrs and 6 days. In B, some of the 28°C RFM475 transformants shown in A were also photographed after an incubation of 28 hrs. The relevant phenotype of the plasmid DNAs is indicated in parentheses.

A



B



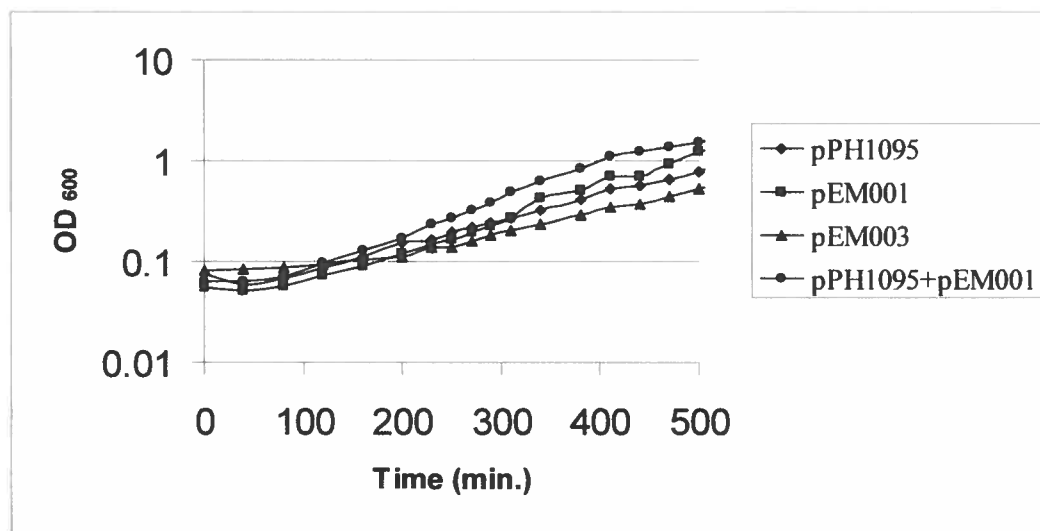


Fig. 2. Complementation of the growth defect of a *topA* null mutant by topoisomerase III at 28°C, in liquid LB media. Overnight cultures in LB medium of RFM475 cells carrying the indicated plasmid DNAs were diluted 1/75 in fresh prewarmed LB medium supplemented with the appropriate antibiotics. The cells were grown at 28°C.

Table III. Ratio of colonies at 28°C or 21°C to colonies at 37°C

Strains	28°C	21°C
RFM475/pEM003 (<i>rnhA</i> ⁻)	- ^a	- ^a
RFM475/pEM001 (<i>rnhA</i> ⁻)	0.86	- ^a
RFM475/pPH1095 (<i>topB</i> ⁺)	0.88	0.64
RFM475/pPH1095 + pEM003 (<i>topB</i> ⁺ , <i>rnhA</i> ⁻)	0.86	0.52
RFM475/pPH1095+ pEM001 (<i>topB</i> ⁺ , <i>rnhA</i> ⁻)	0.79	0.57

Cells were grown to saturation at 37°C in LB medium supplemented with the appropriate antibiotics, diluted and plated on LB media. Incubations at 37, 28 and 21°C were respectively for 1, 2 and 6 days. The results shown here represent the average ratio of three independent experiments. The relevant phenotype of the plasmid DNAs is indicated in parentheses.

^a After prolonged incubation periods, a large number of colonies appeared. They are made of fast growing cells that have acquired compensatory mutations as previously shown (Drolet *et al.*, 1995).

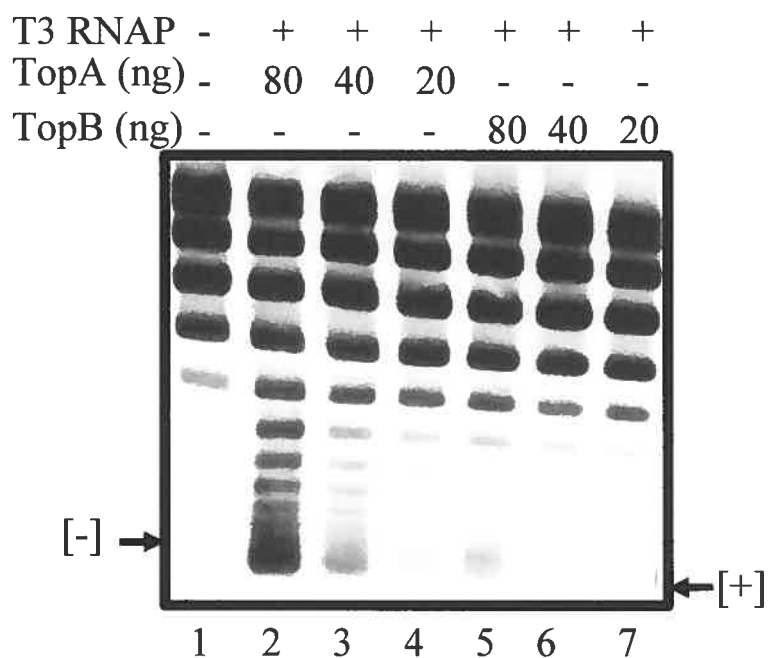


Fig. 3. Topoisomerase III relaxes transcription-induced negative supercoiling *in vitro*. Relaxed pJP459 DNA was transcribed with T3 RNA polymerase in the presence or not of DNA topoisomerase I or III at the indicated amount, as described in Experimental procedures. The DNA samples were analyzed by electrophoresis in a 0.8% agarose gel. [+] and [-] respectively indicate positively and negatively supercoiled pJP459 DNA.

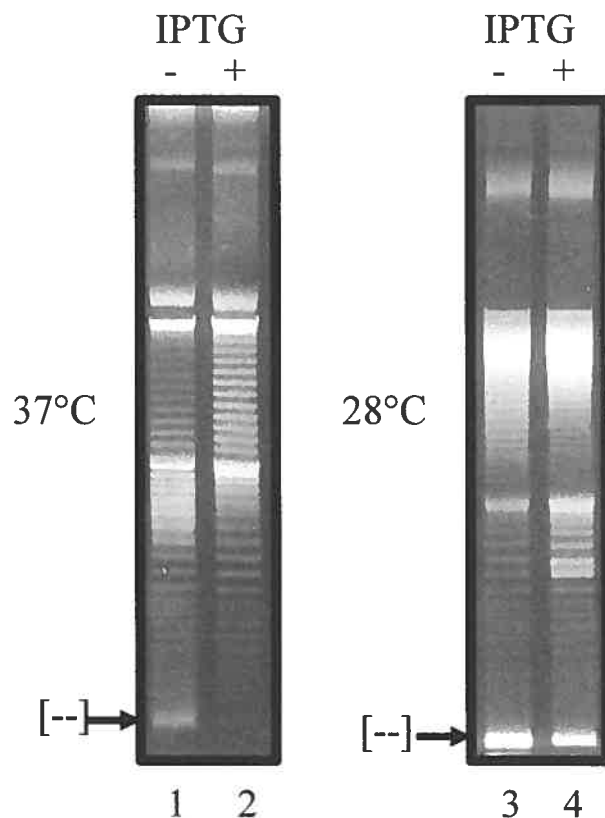


Fig. 4. Topoisomerase III relaxes transcription-induced negative supercoiling *in vivo*. RFM480 cells carrying pACYC184 and pPH1243 were grown in LB medium at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.4 at which time IPTG at 1 mM was added or not as indicated. After an incubation of 5 min. at 37°C one half of the cells was transferred to 28°C and the other half was kept at 37°C. The cells were grown to an OD₆₀₀ of 0.7. Plasmid DNAs were extracted as described in Experimental procedures. The DNA samples were analyzed by electrophoresis in agarose gel in the presence of 5 µg/ml of chloroquine. [--] indicates highly negatively supercoiled pACYC184 DNA.

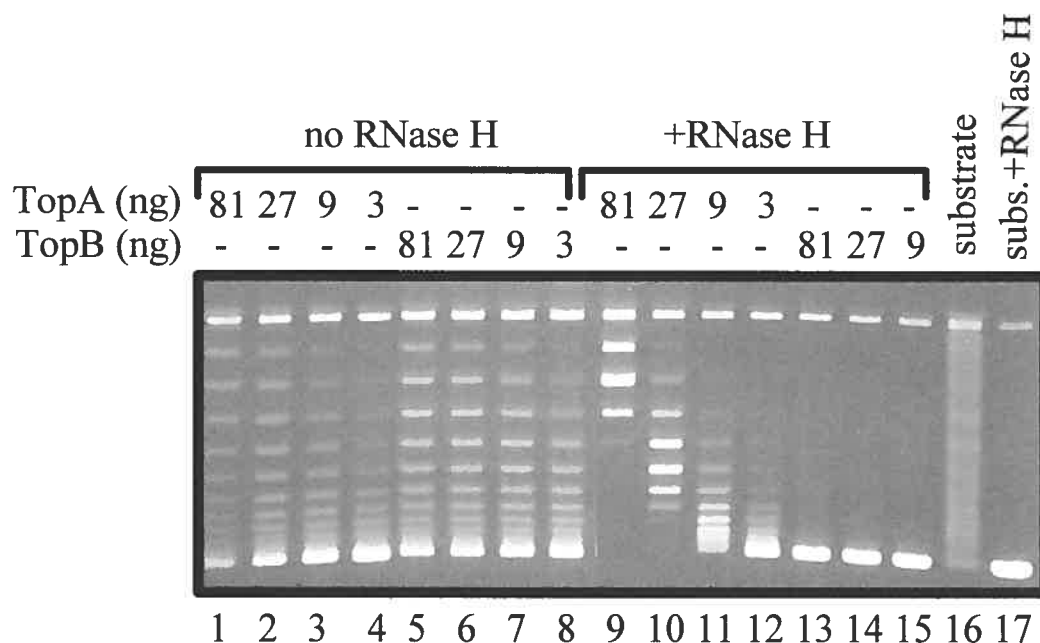


Fig. 5. An R-looped DNA template is efficiently relaxed by DNA topoisomerase III *in vitro*. R-looped pJP459 DNA was prepared as described in Experimental procedures and treated or not with RNase H as indicated. The DNA was then treated or not with DNA topoisomerase I or III at the indicated amount. Note that the relaxation assays were performed in the same buffer as the one used in the *in vitro* transcription assays shown in Fig. 3. After an RNase H treatment, the samples were analyzed by electrophoresis in a 0.8% agarose gel. Substrate and subs. +RNase H respectively represent aliquots of R-looped pJP459 not treated or treated with RNase H.

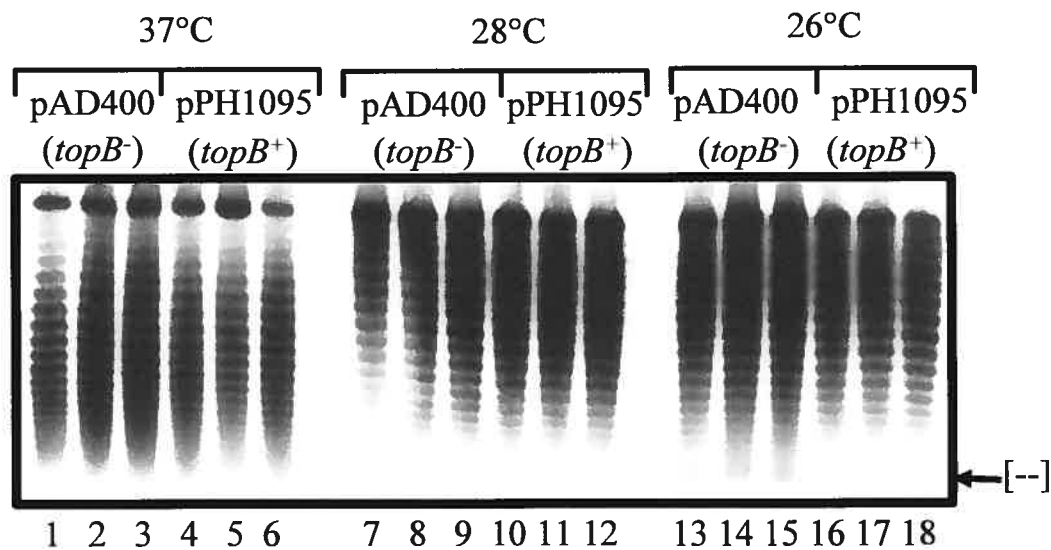


Fig. 6. Overproduction of topoisomerase III reduces the formation of R-loop-dependent hypernegatively supercoiled DNA in a *topA* null mutant. RFM480 cells carrying pBR322 Δ *tet5'* and pAD400 or pPH1095 were grown and the plasmid DNAs were extracted as described in Experimental procedures. The samples were analyzed by electrophoresis in an agarose gel containing 7.5 μ g/ml of chloroquine. The gel was probed with a 32 P-labeled DNA fragment carrying the *bla* gene of pBR322. A triplicate of independent experiments is shown to emphasize the reproducibility of the data and the fact that overproduction of DNA topoisomerase III never altered the global supercoiling level. The relevant phenotype of the plasmid DNAs is indicated in parentheses.

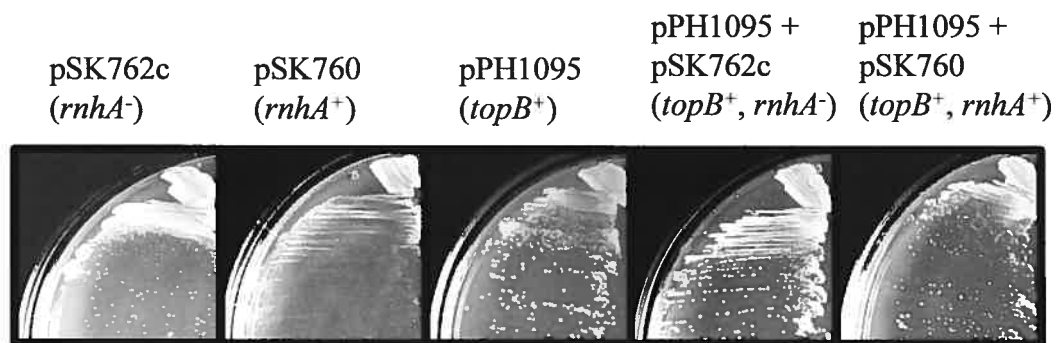


Fig. 7. Overproduction of topoisomerase III counteracts the negative effect of overexpressing RNase H activity in a *topA* null mutant at low temperatures. DM800 cells carrying the indicated plasmid DNAs were first streaked for single colonies at 37⁰C on LB media supplemented with the appropriate antibiotics. Four colonies of each DM800 transformant were then resuspended in 50 μ l of LB medium, and 2 μ l of this bacterial suspension were streaked for single colonies on LB media. The plates were incubated at 21⁰C for 4.5 days. The relevant phenotype of the plasmid DNAs is indicated in parentheses.

References

- DiGate, R. J. and Marians, K. J. (1988) Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 13366- 13373.
- DiGate, R. J. and Marians, K. J. (1989) Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17924- 17930.
- DiNardo, S., Voelkel, K. A., Strernglanz, R., Reynolds, A. E. and Wright, A. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*, **31**, 43- 51.
- Dorman, C. J., Lynch, A. S., Ni Bhriain, N. and Higgins, C. F. (1989) DNA supercoiling in *Escherichia coli*: *topA* mutations can be suppressed by DNA amplifications involving the *tolC* locus. *Mol. Microbiol.*, **3**, 531- 540.
- Drlica, K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.*, **6**, 425- 433.
- Drolet, M., Bi, X. and Liu, L. F. (1994) Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2068- 2074.
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L. F. and Crouch, R.J. (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* $\Delta topA$ mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 3526- 3530.

- Free, A. and Dorman, C. J. (1994) *Escherichia coli tyrT* gene transcription is sensitive to DNA supercoiling in its native chromosomal context: effect of DNA topoisomerase IV overexpression on *tyrT* promoter function. *Mol. Microbiol.*, **14**, 151- 161.
- Hiasa, H., DiGate, R.J. and Marians, K.J. (1994) Decatenating activity of *E. coli* DNA gyrase and topoisomerase I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2093- 2099.
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S. and Suzuki, H. (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*, **63**, 393- 404.
- Kohara, Y., Akiyama, K. and Isono, K. (1987) The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell*, **50**, 495- 508.
- Liu, L.F. and Wang, J. C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 7024- 7027.
- Lynch, A. S. and Wang, J. C. (1993) Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J. Bacteriol.*, **175**, 1645- 1655.
- Massé, E. and Drolet, M. (1999a) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16659- 16664.

- Massé, E. and Drolet, M. (1999b) Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16654- 16658.
- Massé, E., Phoenix, P. and Drolet, M. (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12816- 12823.
- McNairn, E., Ni Bhriain, N. and Dorman, C. J. (1995) Overexpression of the *Shigella flexneri* genes coding for DNA topoisomerase IV compensates for loss of DNA topoisomerase I: effect on virulence gene expression. *Mol. Microbiol.*, **15**, 507- 517.
- Noël, G. and Drapeau, G. R. (1986) Identification of new cell division genes in *Escherichia coli* by using extragenic suppressors. *J. Bacteriol.*, **165**, 399- 404.
- Phoenix, P., Raymond, M.-A., Massé, E. and Drolet, M. (1997) Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 1473- 1479.
- Pruss, G. J. and Drlica, K. (1986) Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 8952- 8956.
- Pruss, G.J., Manes, S.H. and Drlica, K. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near the gyrase genes. *Cell*, **31**, 35- 42.

- Raji, A., Zabel, D. J., Laufer, C. S. and Depew, R. E. (1985) Genetic analysis of mutations that compensate for loss of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Bacteriol.*, **162**, 1173- 1179.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Stoker, N. G., Fairweather, N. F. and Spratt, B. G. (1982) Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene*, **18**, 335-341.
- Tsao, Y. P., Wu, H.-Y. and Liu, L. F. (1989) Transcription-driven supercoiling of DNA: Direct biochemical evidence from *in vitro* studies. *Cell*, **56**, 111-118.
- Wang, J. C. (1971) Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J. Mol. Biol.*, **55**, 523- 533.
- Wang, J. C. (1996) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 635- 692.
- Weinreich, M.D., Yigit, H. and Reznikoff, W.R. (1994) Overexpression of the Tn5 transposase in *Escherichia coli* results in filamentation, aberrant nucleoid segregation, and cell death: analysis of *E. coli* and transposase suppressor mutations. *J. Bacteriol.*, **176**, 5494- 5504.
- Wu, H.Y., Shyy, S.H., Wang, J.C. and Liu, L. F. (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*, **53**, 433- 440.

- Yigit, H. and Reznikoff, W. S. (1997) Examination of the Tn5 transposase overproduction phenotype in *Escherichia coli* and localization of a suppressor of transposase overproduction killing that is an allele of *rpoH*. *J. Bacteriol.*, **179**, 1704- 1713.
- Yigit, H. and Reznikoff, W. S. (1998) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I and suppression of killing by Tn5 transposase overproduction: topoisomerase I modulates Tn5 transposition. *J. Bacteriol.*, **180**, 5866- 5874.
- Yigit, H. and Reznikoff, W. S. (1999) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I copurifies with Tn5 transposase, and Tn5 transposase inhibits topoisomerase I. *J. Bacteriol.*, **181**, 3185- 3192.

« Effects of RNA polymerase modifications on transcription- induced negative supercoiling and associated R-loop formation. » par Broccoli, S., Rallu, F., Sanscartier, P., Cerritelli, S. M., Crouch, R. J. & Drolet, M. (2004) *Molecular Microbiology*, sous presse.

Il a précédemment été démontré que la transcription sur des plasmides en absence de topoisomérase I, mais en présence de gyrase, peut entraîner la formation de R-loops inhibiteurs *in vivo* et *in vitro*. Le couplage entre la transcription et la traduction chez les bactéries devrait empêcher la formation de ces structures. Le fait que l'hypersurenroulement dû à la transcription d'une version non traduite du gène *tetA* soit sensible à la RNase HI soutient cette hypothèse. À notre surprise, nous avons constaté que l'ajout d'un inhibiteur de la synthèse protéique stimule l'hypersurenroulement lié à la transcription de ce gène *tetA* modifié et le rend résistant à l'action de la RNase HI. Cette réaction dépend de la capacité de l'ARN polymérase à synthétiser de longs transcrits, tel que montré par les effets négatifs d'une mutation de l'ARN polymérase et du système d'antiterminaison sur l'accumulation de plasmides hypersurenroulés négativement. Nous avons trouvé que l'hypersurenroulement et les ARNs sont considérablement stabilisés par les inhibiteurs de la synthèse protéique. Ces résultats suggèrent que lorsque la traduction est inhibée, l'ARN naissant libre peut atteindre une longueur critique avant d'être dégradé par des ribonucléases et peut contribuer à générer un niveau important de surenroulement positif pendant la transcription, qui est ensuite relaxé par la gyrase. Cette activité de la gyrase est probablement favorisée par rapport à celle de relaxation du surenroulement négatif en raison d'une augmentation des concentrations d'ATP intracellulaires dans ces conditions. Ceci permet une accumulation d'ADN hypersurenroulé négativement. Nos résultats montrent que l'hypersurenroulement chez les mutants $\Delta topA$ peut être lié aux R-loops, à la transcription/ traduction couplées de gènes dont le produit est ancré à la membrane dans le contexte du «Twin- Domain model », mais peut également dépendre de la transcription de gènes non traduits dans le contexte du «Twin- Domain model » tel que montré *in vitro*. En tant

qu'auteur principal de cet article, j'ai contribué 85% des résultats montrés ici et j'ai activement participé à la rédaction du manuscrit.

Effects of RNA polymerase modifications on transcription- induced negative supercoiling and associated R-loop formation.

Sonia Broccoli¹, Fabien Rallu¹, Patrick Sanscartier¹, Susana M. Cerritelli², Robert J. Crouch² and Marc Drolet^{1,3}

¹*Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, P. Québec, Canada, H3C 3J7; and*

²*Laboratory of Molecular Genetics, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892 USA*

³*Corresponding author*

Phone: 514-343-5796

FAX: 514-343-5701



Running title: RNA polymerase in transcription-induced supercoiling.

Key words: Escherichia coli, DNA topoisomerase I, transcription- induced supercoiling, R-loop, RNA-DNA hybrid

Abstract

Transcription in the absence of topoisomerase I, but in the presence of DNA gyrase, can result in the formation of hypernegatively supercoiled DNA and associated R-loops. In this paper, we have used several strategies to study the effects of elongation/termination properties of RNA polymerase on such transcription-induced supercoiling. Effects on R-loop formation were exacerbated when cells were exposed to translation inhibitors, a condition that stimulated the accumulation of R-loop-dependent hypernegative supercoiling. Translation inhibitors were not acting by decreasing (p)ppGpp levels since the absence of (p)ppGpp in *spoT relA* mutant strains had little effect on hypernegative supercoiling. However, an *rpoB* mutation leading to the accumulation of truncated RNAs considerably reduced R-loop-dependent hypernegative supercoiling. Transcription of an *rrnB* fragment preceded by a mutated and inactive *boxA* sequence to abolish the *rrnB* antitermination system also considerably reduced R-loop-dependent supercoiling. Taken together, our results indicate that RNA polymerase elongation/termination properties can have a major impact on R-loop-dependent supercoiling. We discuss different possibilities whereby RNA polymerase directly or indirectly participates in R-loop formation in *Escherichia coli*. Finally, our results also indicate that what determines the steady-state level of hypernegatively supercoiled DNA in *topA* null mutants is likely to be complex and involves a multitude of factors, including the status of RNA polymerase, transcription-translation coupling, the cellular level of RNase HI, the status of DNA gyrase and the rate of relaxation of supercoiled DNA.

Introduction

DNA topoisomerase I, encoded by the *topA* gene, is a type IA topoisomerase involved in relaxation of negative supercoiling in *Escherichia coli* (Tse-Dinh, 1998; Wang, 2002). Transcription has been shown to be a major source of supercoiling in the cell (Drolet *et al.*, 2003). The twin-domain model predicts that any situation that hinders rotation of RNA polymerase as transcription proceeds will cause the DNA to rotate upon itself, leading to an accumulation of negative and positive supercoiling, respectively, behind and ahead of the moving transcription complex (Liu and Wang, 1987). Topoisomerase I relaxes negative supercoiling whereas gyrase relieves positive supercoiling. This model has been supported by results of many experiments, though there remain some questions about the mechanism(s) by which rotation of RNA polymerase can be sufficiently impaired for transcription-induced supercoiling to occur (for example see Lynch and Wang, 1993; Albert *et al.*, 1996). A recent study showed that growth inhibition of *topA* null mutants correlates with transcription-induced negative supercoiling, and, therefore, that the major function of this enzyme is to relax such supercoiling (Massé and Drolet, 1999a). One important consequence of transcription-induced negative supercoiling is R-loop formation as RNase HI overproduction partially complements the growth defect of *topA* null mutants (Drolet *et al.*, 1995; Massé and Drolet, 1999b). Moreover, the sensitivity of *topA* null mutants to heat-shock (Qi *et al.*, 1996) was recently shown to be alleviated by RNase HI overproduction (Cheng *et al.*, 2003a). A functional interaction between topoisomerase I and transcription is also supported by the recent demonstration of its physical interaction with RNA polymerase (Cheng *et al.*, 2003b).

Evidence for R-loop formation in the absence of topoisomerase I both *in vitro* and *in vivo* is based on the formation of RNase HI-sensitive hypernegatively supercoiled plasmids and R-looped plasmids (Drolet *et al.*, 1994; Phoenix *et al.*, 1997; Massé *et al.*, 1997; Massé and Drolet, 1999b). When topoisomerase I is present, anchoring of the TetA protein to the membrane does not lead to

hypernegative supercoiling. However, topological changes are noted when *topA* mutant strains express the TetA protein. With the wild-type *tetA* gene, co-transcription-translation generates hypernegatively supercoiled pBR322 DNA in accordance with the twin-domain model, because anchoring of the nascent TetA peptide to the membrane completely blocks rotation of the transcribing RNA polymerase (Fig. 1a, p. 108; Lynch and Wang, 1993). Similar hypernegative supercoiling is observed in *topA* mutant strains when translation of the TetA protein is inhibited either by mutation or by addition of protein synthesis inhibitors (Massé and Drolet, 1999b). This latter result indicates that tight coupling of translation and transcription in bacteria should inhibit R-loop formation. In addition, R-loop formation *in vivo* has been demonstrated using a *HindIII* fragment from the *rrnB* operon (Massé *et al.*, 1997). Altogether, these results were interpreted to mean that extensive R-loop formation occurs in the absence of topoisomerase I, when the *tetA* gene is transcribed but not translated. In this model, the nascent mRNA, free of ribosomes, is available to reanneal with the template strand behind the moving RNA polymerase (Fig. 1b, p. 108).

One important unresolved issue is the role RNA polymerase plays in R-loop formation in *topA* null strains. Indeed, nothing is known about the properties, if any, of RNA polymerase that influence R-loop formation in the absence of topoisomerase I. In this work we have used different approaches to address this question. Our results demonstrate that elongation/termination properties of RNA polymerase can dramatically influence R-loop-dependent hypernegative supercoiling. Moreover, we found that the relaxation activity of DNA gyrase on negatively supercoiled DNA is considerably reduced upon addition of translation inhibitors, which can explain the accumulation of hypernegatively supercoiled DNA under conditions where all the transcripts are free to form R-loops.

Results

A mutated and inactive antitermination system considerably reduces R-loop-dependent hypernegative supercoiling due to transcription of an rrnB DNA fragment.

We have previously shown that transcription of the 567 bp *Hind*III fragment from the *rrnB* operon, in its physiological orientation, results in R-loop formation as detected by hypernegative supercoiling and gel retardation, during *in vitro* transcription with either T7 or *E. coli* RNA polymerases and in the presence of DNA gyrase (Phoenix *et al.*, 1997; Massé *et al.*, 1997). Similar results were obtained *in vivo* in *topA* null mutants with *E. coli* RNA polymerase (Massé *et al.*, 1997). These *in vivo* results were obtained by using a pTrc99a-derivative, pMD306, in which the *Hind*III *rrnB* fragment preceded by a *boxA* element, is under the control of the IPTG-inducible *P**trc* promoter. The vector also carries the *lacI^q* gene to efficiently repress transcription of this fragment in the absence of IPTG. *boxA* is the minimal sequence acting in *cis* at the RNA level to build an antitermination system for rRNA synthesis. Such a system, which also increases the velocity of RNA polymerase (Vogel and Jensen, 1995), is required to prevent *rho*-dependent premature transcription termination of this untranslated RNA (Condon *et al.*, 1995).

As we found that *lacI^q* transcription was also contributing to R-loop-dependent hypernegative supercoiling (data not shown), we constructed a pMD306-derivative bearing a deletion of the 5' section of the *lacI^q* gene including its promoter, thus yielding pMD306Δ*lacI^q*. This plasmid was introduced in a *topA* null *gyrB*(Ts) strain (Drolet *et al.*, 1995). DNA gyrase in this strain has wild-type levels of activity at 28°C but is compromised enough to compensate for the absence of topoisomerase I at 37°C. Two pACYC184-derivatives carrying the *lacI^q* gene and a wild-type (pEM505) or inactivated (pEM505Δ*rnhA*) *rnhA* gene under the control of the *P**trc* promoter were introduced individually into this *topA*

null strain. R-loop-dependent hypernegatively supercoiled DNA occurs upon addition of IPTG at 28°C (Fig. 2a top panel p. 110, compare lanes 13 and 14) that is significantly reduced by overproduction of RNase HI (compare lanes 10 and 14).

To further support our conclusion that the effect of pEM505 versus pEM505 Δ *rnhA* on hypernegative supercoiling is related to RNase HI overproduction, we inhibited protein synthesis and therefore RNase HI overproduction, before the addition of IPTG to induce transcription of the *rrnB* DNA fragment. The results presented in Fig. 2a, top panel, clearly show that the negative effect of pEM505 on hypernegative supercoiling is lost when spectinomycin is added prior to IPTG (compare lane 12, pEM505, with lane 16, pEM505 Δ *rnhA*). In fact, the proportion of hypernegatively supercoiled pMD306 Δ *lacI*^f is even greater when the *topA* null cells carry pEM505 rather than pEM505 Δ *rnhA*. These results support our conclusion that the effect of pEM505 on hypernegative supercoiling is mediated through RNase HI overproduction.

Plasmid instability was previously noted when transcription of the *rrnB* 567 bp *Hind*III fragment included a wild-type *boxA* sequence (pMD306) unless RNase HI was overproduced in the *topA* null strain (Drolet *et al.*, 2003). In order to better correlate this observation with R-loop formation, we analyzed hypernegative supercoiling of pMD315 Δ *lacI*^f whose *boxA* sequence has been inactivated by mutation. The *boxA4UG* mutation was previously shown to abolish the antitermination system both *in vivo* and *in vitro*, including its effect on transcription velocity (Albrechtsen *et al.*, 1990; Squires, *et al.*, 1993; Vogel and Jensen, 1995). Fig. 2a p. 110, bottom panel, shows that hypernegative supercoiling is much less efficient when the *boxA* sequence is mutated (compare lane 14 of the top panel, *boxA* wild-type, with lane 14 of the bottom panel, *boxA4UG*). This difference is also evident when spectinomycin is added before IPTG (compare lanes 12 and 16 of the top panel, *boxA* wild-type, with respectively lanes 12 and 16 of the bottom panel, *boxA4UG*). Two-dimensional

gel analysis further confirms this result and the presence of hypernegatively supercoiled DNA (Fig. 2b, p. 110).

A mutation in RNA polymerase causing accumulation of prematurely terminated tetA mRNAs dramatically reduces R-loop-dependent hypernegative supercoiling of pBR322.

We pursued our studies on the effects of RNA polymerase modifications on hypernegative supercoiling by testing the involvement of (p)ppGpp on transcription-induced supercoiling. This small effector acts by binding to RNA polymerase, altering its properties during transcription initiation and elongation (Chatterji and Ojha, 2001). Upon the addition of translation inhibitors, intracellular (p)ppGpp concentrations drop to nearly zero (Cashel *et al.*, 1996). As we have found that translation inhibitors stimulate hypernegative supercoiling, we considered the possibility that (p)ppGpp could negatively affect transcription-induced supercoiling. To test this, we constructed a ppGpp⁰ derivative of our *topA* null mutant by deleting both its *relA* and *spoT* genes (see Experimental Procedures). In addition, we isolated a spontaneous stringent *rpoB* mutant (Rif^R) of this *topA* null ppGpp⁰ strain on minimal medium (see Experimental Procedures). Fig. 3a, p.112 shows that elimination of (p)ppGpp had no effect on either membrane anchorage- or R-loop-dependent supercoiling (lanes 5 and 6, RFM475; lanes 7 and 8, RFM475 ppGpp⁰). Strains carrying the *rpoB* mutation exhibited hypernegative supercoiling due to anchoring of the TetA protein similarly to that with wild-type *rpoB* strains (lane 5, RFM475; lane 7, RFM475 ppGpp⁰; lane 9, RFM475 ppGpp⁰ *rpoB108*). In contrast, R-loop-dependent hypernegative supercoiling is not induced upon addition of spectinomycin especially when compared to the effect on other strains (lane 6, RFM475; lane 8, RFM475 ppGpp⁰; lane 10, RFM475 ppGpp⁰ *rpoB108*).

We also extracted RNA from the cells carrying pBR322, in order to evaluate the amount and the size of the *tetA* mRNA produced by the various

strains. Fig. 3b, p. 113 clearly shows that the strain carrying the *rpoB* mutation produces large amounts of prematurely terminated *tetA* mRNA (lane 5). Taken together these results suggest that the *rpoB108* mutation causes a termination defect which, in turn, considerably impedes R-loop-dependent hypernegative supercoiling. Consistent with this interpretation, is the finding that our *topA* null strain requires less RNase HI activity for growth at the non-permissive temperature (28°C) when it carries the *rpoB108* rather than a wild-type allele (data not shown). It is known that only the amino-terminal section of the TetA peptide that is involved in membrane anchorage is required for hypernegative supercoiling by the anchor-dependent mechanism (Lodge *et al.*, 1989). We believe that even the prematurely terminated *tetA* mRNA can produce this peptide thus accounting for the absence of an effect of the *rpoB108* on membrane anchorage-dependent hypernegative supercoiling.

Fig. 4, p. 114 shows the formation of hypernegatively supercoiled pEM301, a pSC101-based replicon, at 28°C (lane 3) that is significantly reduced by overproduction of RNase HI (i.e., is R-loop-dependent) (lane 1). It also demonstrates, once again, stimulation of R-loop-dependent hypernegative supercoiling by the addition of a protein synthesis inhibitor (amikacin; lanes 2 and 4), as well as the failure to produce a significant amount of R-loop-dependent hypernegatively supercoiled DNA when the *rpoB108* mutation is present (lanes 5 to 8). Therefore, the effects of translation inhibitors and the *rpoB108* mutation on R-loop-dependent hypernegative supercoiling, are not restricted to ColE1-like replicons.

Stabilization of untranslated mRNAs resulting from addition of protein synthesis inhibitors correlates with hypernegative supercoiling

Our results demonstrate that translation inhibitors significantly stimulate hypernegative supercoiling, even when the transcribed gene encodes an untranslated RNA (Fig. 2, p. 110, pMD306ΔlacI^q and pMD315ΔlacI^q). To further

demonstrate this point, we measured hypernegative supercoiling of a pBR322 derivative, pBR322 Δ tet5', which carries a deletion removing both the ribosome binding site and the ATG initiation codon of the *tetA* gene (Massé and Drolet, 1999a). R-loop-dependent hypernegative supercoiling of this plasmid was shown to occur in a *topA* null mutant with an active DNA gyrase and was found to be dependent of the transcription of this modified *tetA* gene (Massé and Drolet, 1999b). Fig. 5a, p. 116 demonstrates the stimulation of hypernegative supercoiling by the addition of spectinomycin to all the *topA* null mutant strains, except for the one carrying the *rpoB108* allele (lane 10), confirming the results obtained with the wild-type pBR322 (Fig. 3a, p. 112).

Fig 5b, p. 116 shows the loss of sensitivity of hypernegative supercoiling to RNase HI overproduction when spectinomycin is added to the cell culture (compare lane 3, overproduction of RNase HI, with lane 4, no overproduction of RNase HI). This is not related to RNase HI instability, as we found that the levels of activity of this enzyme were unaltered by the spectinomycin treatment (not shown). In the presence of spectinomycin, all the transcripts are not translated and therefore are free to form R-loops. Thus, we believe that even the excess RNase HI produced from pEM001 is insufficient to eliminate all of the R-loops formed when protein synthesis inhibitors are added. In agreement with this interpretation is our finding that hypernegative supercoiling of pBR322 in the presence of translation inhibitors is sensitive to RNase HI when the *rnhA* gene is placed under control of a very strong promoter to achieve high levels of RNase HI (not shown).

Previous studies have demonstrated the very low stability of mRNAs that had been modified to make them untranslatable. For example, when the Shine-Dalgarno sequence of the *lacZ* mRNA is inactivated, full-length *lacZ* mRNAs are not produced even when transcription originates from a very strong promoter (Lopez *et al.*, 1998). Upon the addition of translation inhibitors, full-length *lacZ* transcripts are then found to accumulate as a result of their dramatic increase in stability due to the ability of the nascent mRNAs to escape degradation.

Stabilization of RNAs when protein synthesis is arrested by translation inhibitors is related to a depletion of RNases involved in RNA decay (Lopez *et al.*, 1998). Degradation of an untranslatable nascent *tetA* mRNA can certainly affect R-loop-dependent hypernegative supercoiling considering the fact that this nascent RNA actively participates in R-loop formation. In this context, the addition of a translation inhibitor is expected to stimulate hypernegative supercoiling by this mechanism (Fig. 3, p. 112, 113 and 5, p. 116) since *tetA* transcripts should be stabilized. Results shown in fig. 6, p. 117 demonstrate accumulation of *tetA* mRNA transcripts in all the strains, when spectinomycin is added to the cell culture. By using rifampicin, we found that this is due to the increased stability of the *tetA* transcript in the presence of spectinomycin (not shown).

Translation inhibitors stabilize hypernegatively supercoiled DNA in a manner depending upon DNA gyrase activity.

An important determinant of the steady-state level of hypernegatively supercoiled DNA is its rate of relaxation. To study the stability of hypernegatively supercoiled pBR322, rifampicin was added to inhibit transcription and hence stop formation of such topoisomers. DNA was then extracted at different time intervals after addition of rifampicin to follow the relaxation of hypernegatively supercoiled pBR322. Fig. 7, p. 118 shows that more than half of hypernegatively supercoiled pBR322 was relaxed ten min. after the addition of rifampicin to the cell culture (compare lane 1 with lane 3). However, when a protein synthesis inhibitor was added before rifampicin, stability of hypernegatively supercoiled pBR322 was found to be considerably enhanced. Indeed, more than half of such topoisomers were still present 20 min. after the addition of rifampicin (compare lane 5 with lane 8). This result clearly demonstrates that a major effect of protein synthesis inhibitors on hypernegative supercoiling is to increase their stability. In RFM475, the most likely controller of the steady-state level of hypernegative supercoiling is gyrase. To provide supporting evidence that gyrase influences the steady-state level of hypernegative supercoiling, we examined the effect of

gyrB225 on the stability of hypernegative supercoiling. Previously, we reported that the steady-state level of hypernegative supercoiling in a *gyrB225 ΔtopA* strain was considerably lower than that of *gyrB⁺ ΔtopA* or *gyrB(Ts) ΔtopA* strains at 28⁰C (Massé and Drolet, 1999c). Using the *gyrB225 ΔtopA* strain, we noted a rather rapid decay of hypernegative supercoils following addition of rifampicin (not shown). The difference in stability of the hypernegative supercoils in these otherwise isogenic strains suggests that gyrase is involved in both formation and relaxation of these topoisomers.

Discussion

In this paper, we have extended our studies on R-loop formation in *topA* null mutant by investigating the role(s) of RNA polymerase in this phenomenon. RNA polymerase could potentially influence R-loop formation in different ways (see Drolet *et al.*, 2003 for a review). First, transcription velocity can indirectly affect R-loop formation by modulating the level of transcription-induced supercoiling behind the moving RNA polymerase. At higher velocities greater levels of negative supercoiling are likely to be generated and the reannealing of the nascent RNA with the template strand to initiate R-loop formation could be facilitated. Second, premature termination of transcription may also indirectly affect R-loop formation if it occurs before the initiation of R-loops. If the nascent RNA is too short, the level of negative supercoiling behind the transcribing RNA polymerase might be too low to promote R-loop formation. Third, for the moment we cannot exclude the possibility that R-loop formation might originate from the RNA-DNA hybrid within the transcription bubble. In this context, RNA polymerase would be directly involved in R-loop formation and any alteration in its elongation/termination properties could potentially influence R-loop formation.

The results presented in this paper demonstrate that elongation/termination properties of RNA polymerase do significantly influence R-loop formation. First, by inactivating an antitermination system, we found that R-loop-dependent hypernegative supercoiling was considerably reduced. However, as this antitermination system was also previously shown to modulate transcription velocity (Vogel and Jensen, 1995), we cannot simply attribute this finding to termination properties. Interestingly, we have found that *lacZ* expression in our *topA* null mutant is almost completely inhibited unless RNase HI is overproduced when the *lacZ* gene is preceded by a wild-type but not a mutated *boxA* sequence (Sanscartier *et al.*, manuscript in preparation).

Second, results obtained with the *rpoB108* mutation suggest that altered termination properties of RNA polymerase can profoundly affect R-loop formation. We have tested the *rpoB3370* mutation for its effect on hypernegative supercoiling and found it to behave similarly to the *rpoB108* allele (Rallu and Drolet, unpublished results). Interestingly, the *rpoB3370* mutation has been shown to affect termination and antitermination properties of RNA polymerase and to suppress the *rho15* mutation (Jin *et al.*, 1988). We have previously shown that *rpoB8* and *rpoB3595* have divergent effects on the growth of *topA* null mutants (Drolet *et al.*, 1995). The *rpoB8* allele improves growth and behaves like *rpoB108* in R-loop-dependent hypernegative supercoiling (Broccoli and Drolet, unpublished result). This *rpoB8* mutation makes RNA polymerase more prone to terminate, whereas the *rpoB3595* allele has the opposite effect (Jin *et al.*, 1992). Unfortunately, we have been unable to evaluate hypernegative supercoiling in a *topA* null *rpoB3595* double mutant due to rapid accumulation of (an) additional compensatory mutation(s) in this strain (Broccoli and Drolet, unpublished results). Together, these results suggest an interesting link between termination properties of RNA polymerase and R-loop formation. The isolation of the *rpoB108* allele offers a unique opportunity to further investigate this intriguing link employing an *in vitro* transcription system.

The results presented in this paper also reveal the complexity associated with hypernegative supercoiling. This is particularly true when the effect of translation inhibitors on hypernegative supercoiling is analyzed. First, our results indicate that in the presence of translation inhibitors, R-loop formation may occur at multiple sites due to uncoupling of transcription and translation, generating RNA-DNA hybrids in excess of the capacity of RNase HI to remove them (Fig. 5). Interestingly, evidence has been recently presented that *rho* and *nusG* mutants also increase RNA-DNA hybrids to levels beyond which RNase HI is unable to eliminate all of them (Harinarayanan and Gowrishankar, 2003). Second, dramatic stabilization of RNAs following addition of translation inhibitors may significantly contribute to R-loop-dependent hypernegative supercoiling by

promoting synthesis of long nascent RNAs. In this context, it is worth mentioning that a correlation between the length of the nascent RNA and R-loop formation during transcription was recently demonstrated in *Saccharomyces cerevisiae* (Huertas and Aguilera, 2003). For the moment, we cannot exclude the possibility that hypernegative supercoiling due to the synthesis of long nascent RNAs may precede R-loop formation. *In vitro* transcription reactions have clearly shown that transcription-induced supercoiling correlates with the length of the nascent RNA (Tsao *et al.*, 1989; Leng and McMacken, 2002).

Third, we have provided evidence that stimulation of hypernegative supercoiling by translation inhibitors is largely related to an inhibition of the relaxation activity of DNA gyrase. It is known that the supercoiling and relaxation activities of DNA gyrase are influenced both *in vitro* and *in vivo* by the ATP/ADP ratio (Drlica, 1992; Kampranis and Maxwell, 1996; van Workum *et al.*, 1996; Westerhoff *et al.*, 1988), with supercoiling activity being favored at higher ratios. The two-fold increase in ATP concentrations induced by complete inhibition of protein synthesis (Schneider *et al.*, 2002) would thus be expected to favor formation rather than relaxation of hypernegative supercoils. A bias of DNA gyrase toward formation of hypernegative supercoils would explain the observed stabilization of hypernegative supercoils (Fig. 7, p. 118) and could also contribute to the abundance of R-loops formed in the presence of protein synthesis inhibitors. Interestingly, we have tested many translation inhibitors and found a perfect correlation between the minimal concentration required to completely inhibit protein synthesis and that required to observe the maximum amount of hypernegatively supercoiled DNA (not shown). Finally, the fact that hypernegatively supercoiled DNA might be relatively stable could explain several phenotypes associated with the loss of topoisomerase I activity.

Experimental Procedures

E. coli strains

E. coli strains used in this study are listed and described in table 1, p.119. The RFM445 (*gyrB* (Ts)) and RFM475 (*gyrB* (Ts) $\Delta topA$) have been well described (Drolet *et al.* 1995). The double $\Delta relA251::km \Delta spoT207::cat$ (ppGpp⁰) (Xiao *et al.*, 1991) derivatives of RFM445 and RFM475 were constructed by P1vir transduction (Miller, 1992). The ppGpp⁰ phenotype was confirmed by observing their growth on minimal medium (Xiao *et al.*, 1991) and measuring (p)ppGpp synthesis as follows: Strains were grown in MOPS medium (Neidhardt *et al.*, 1974) at 0.3 mM phosphate concentration to exponential phase at 37°C. At an OD₆₀₀ of 0.2, 150 μ Ci/ml of [³²P]-H₃PO₄ (Amersham Biosciences) were added and the cells were grown for one doubling at 37°C. After the addition of one volume of 13 M formic acid, the cells were lysed by three successive freeze-thaw cycles. Samples were centrifuged (13000 rpm for 5 min) and an aliquot of the supernatant was spotted on a polyethyleneimine-cellulose plate (Machery-Nagel) for the separation of the phosphorylated guanosine nucleotides by thin-layer chromatography in 1.5 M KH₂PO₄. The *rpoB108* mutant was isolated by plating the RFM475 $\Delta relA251::km \Delta spoT207::cat$ (ppGpp⁰) strain on minimal VB medium supplemented with rifampicin at a final concentration of 50 μ g/ml. The *rpoB108* mutation, a new Rif^R mutation, is an isoleucine insertion after the isoleucine at position 530 of the *rpoB* gene, due to the insertion of three nucleotides (ATC).

Plasmids

pMD306 has previously been described (Massé *et al.*, 1997). Briefly, it is a pTrc99a derivative which contains an IPTG-inducible 567 bp *Hind*III fragment from *rrnB* preceded by a *boxA* antitermination regulatory sequence. pMD315 is

identical to pMD306 but carries the *boxA4UG* mutation (Squires *et al.*, 1993) which inactivates the *boxA* antitermination regulatory element. A 872 bp *Bss*HI deletion was performed on both pMD306 and pMD315 to eliminate the 5' portion of the *lacI^q* repressor gene including its promoter region, thus yielding pMD306 Δ *lacI^q* and pMD315 Δ *lacI^q*. pEM505 is a pACYC184 derivative bearing an IPTG- inducible *rnhA* gene. A *Nde*I (blunted)- *Bsp*HI fragment containing *lacI^q*, the promoter sequence and the *rnhA* sequence from pPH310 (Drolet *et al.*, 1995), a pTrc99a-derivative with an IPTG-inducible *rnhA* gene, was subcloned into the *Hinc*II-*Bsp*HI sites of pACYC184. An internal *Bam*HI deletion was performed to inactivate the *rnhA* gene, thus yielding pEM505 Δ *rnhA*. pBR322 Δ *tet5'* is a pBR322 derivative where a *Hind*III- *Eco*RV deletion removed the 5' portion of the *tetA* gene bearing the transmembrane domain responsible for membrane anchorage of the TetA protein (Massé and Drolet, 1999a). During construction of this plasmid, a promoter sequence was reconstituted. The *tetA* gene is therefore transcribed but not translated. pEM301 is a pGB2-derivative (pSC101 replicon) also bearing an IPTG-inducible *rnhA* gene. Like pEM505, the *Nde*I (blunted)- *Bsp*HI fragment containing *lacI^q*, the promoter sequence and the *rnhA* sequence from pPH310 was subcloned into pGB2. pSK760 and pSK762c are pBR322 derivatives which carry the wild-type or a mutated and inactive version of the *rnhA* gene (Drolet *et al.*, 1995). pEM001 and pEM003 are respectively the equivalents of pSK760 and pSK762c but are pACYC184-based replicons (Massé *et al.*, 1997).

Plasmid extraction for supercoiling analysis

Unless otherwise indicated, cells containing plasmids of interest were grown overnight in MOPS medium (Neidhardt *et al.*, 1974) at 37°C. MOPS minimal medium was supplemented with all 20 amino acids at a concentration of 0.2%. When required, antibiotics were added as follows: ampicillin at 50 μ g/ml, kanamycin at 50 μ g/ml, chloramphenicol at 30 μ g/ml, spectinomycin at 50 μ g/ml. When required, IPTG was added at a concentration of 1 mM final. Overnight cultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.02 in prewarmed, adequately supplemented

MOPS medium. Cells were grown to an OD₆₀₀ of 0.4 at 37°C at which time cultures were split and protein synthesis inhibitors such as spectinomycin or amikacin were added at a concentration of 400 µg/ml. Cultures were further incubated at 37°C for 15 minutes before being transferred to 28°C for 1 hour or maintained at 37°C for 1 hour. Growth was arrested by transferring cells into a tube filled with ice, thus immediately lowering the temperature of the culture to 0°C. Plasmid DNAs were extracted by alkaline lysis as previously described (Massé *et al.*, 1997). When stability of hypernegative supercoiling was evaluated, rifampicin was added at 250 µg/ml after incubation of 1 hour at indicated temperatures before plasmid extraction.

Electrophoresis

One-dimensional and two-dimensional agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine (7.5 µg/ml and 30 µg/ml for 2nd dimension of 2-D gels) were performed in 0.5x TBE as described (Massé *et al.*, 1997). After electrophoresis, the gels were dried and prepared for *in situ* hybridization as described (Massé *et al.*, 1997). The presence of hypernegatively supercoiled DNA was confirmed by 2-D gel analysis for at least two DNA samples in each experiment. An example is shown in Fig. 2b.

RNA extraction

RNA was extracted from the same cultures as those for plasmid extractions described above. When cells were collected for plasmid extractions, 2ml samples were also collected for RNA extractions. RNA extraction was performed by using the TRIZOL reagent (Invitrogen) as described (Wassarman and Storz, 2000). For RNA analysis, 10 µg of RNA were loaded on denaturing agarose or polyacrylamide gels (Jerome *et al.*, 1999). Membranes were probed with a 55-mer oligo

d(CGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCCTACAGCATCCAGGGTG
ACGGTGCCG) which hybridizes to the 5' region of the pBR322 *tetA* gene.

Acknowledgements

This work was supported by the grant FNR 12667 from the CIHR, to M.D. M.D. is a chercheur-boursier senior from the FRSQ. S.B. holds a studentship award from the CIHR. We thank Patrick Hallenbeck and Russell J. DiGate for critical reading of the manuscript.

References

- Albrechtsen, B, Squires, C.L., Li, S. and Squires, C. (1990) Antitermination of characterized transcriptional terminators by the *Escherichia coli* *rrnG* leader region. *J Mol Biol*, **213**, 123-134.
- Albert, A.C, Spirito, F., Figueroa-Bossi, N., Bossi, L. and Rahmouni, A.R. (1996) Hyper-negative template DNA supercoiling during transcription of the tetracycline-resistance gene in *topA* mutants is largely constrained *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, **24**, 3093-3099.
- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J., Vinella, D. (1996) The stringent response. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C., Curtiss R., III, Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., *et al.* (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 1458-1496.
- Chatterji, D. and Ojha, A.K. (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 160-165.
- Cheng, B., Rui, S., Ji, C., Gong, V.W., Van Dyk, T.K., Drolet, M. and Tse-Dinh, Y.C. (2003a) RNase H overproduction allows the expression of stress-induced genes in the absence of topoisomerase I. *FEMS Microbiol Lett*, **221**, 237-242.
- Cheng, B., Zhu, C.X., Ji, C., Ahumada, A. and Tse-Dinh, Y.C. (2003b) Direct interaction between *E. coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **278**, 30705-30710.
- Condon C, Squires, C. and Squires, C. L. (1995) Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **59**, 623-645.

- Drlica, K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **6**, 425-433.
- Drolet, M., Bi, X. and Liu, L.F. (1994) Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J Biol Chem*, **269**, 2068-2074.
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L.F. and Crouch, R.J. (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3526-3530.
- Drolet, M., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., Fortin, C., Massé, E. and Baaklini, I. (2003) The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci*, **8**, D210-221.
- Harinarayanan, R. and Gowrishankar, J. (2003) Host factor titration by chromosomal R-loops as a mechanism for runaway plasmid replication in transcription termination-defective mutants of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **332**, 31-46.
- Huertas, P. and Aguilera, A. (2003) Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell*, **12**, 711-721.
- Jerome, L.J., van Biesen, T. and Frost, L.S. (1999) Degradation of FinP antisense RNA from F-like plasmids: the RNA-binding protein, FinO, protects FinP from ribonuclease E. *J Mol Biol*, **285**, 1457-1473.

- Jin, D.J, Burgess, R.R., Richardson, J.P. and Gross C.A. (1992) Termination efficiency at *rho*-dependent terminators depends on kinetic coupling between RNA polymerase and *rho*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1453-1457.
- Jin, D.J, Walter, W.A. and Gross, C.A. (1988) Characterization of the termination phenotypes of rifampicin-resistant mutants. *J Mol Biol*, **202**, 245-253.
- Kampranis, S.C. and Maxwell, A. (1996) Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 14416-14421.
- Leng, F. and McMacken, R. (2002) Potent stimulation of transcription-coupled DNA supercoiling by sequence-specific DNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 9139-9144.
- Liu, L.F. and Wang, J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7024-7027.
- Lodge, J.K., Kazic, T. and Berg, D.E. (1989) Formation of supercoiling domains in plasmid pBR322. *J Bacteriol*, **171**, 2181-2187.
- Lopez, P.J., Marchand, I., Yarchuk, O. and Dreyfus, M. (1998) Translation inhibitors stabilize *Escherichia coli* mRNAs independently of ribosome protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6067-6072.
- Lynch, A.S. and Wang, J. C. (1993) Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J Bacteriol*, **175**, 1645-1655.

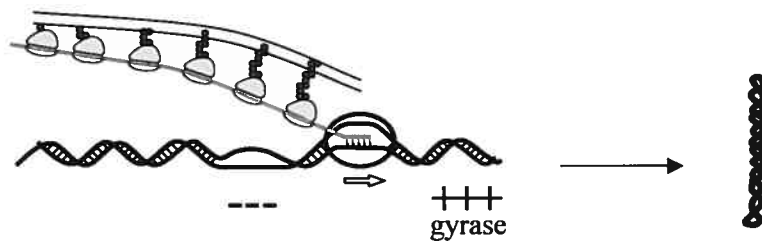
- Massé, E., Phoenix, P. and Drolet, M. (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **272**, 12816-12823.
- Massé, E. and Drolet, M. (1999a) Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **274**, 16654-16658.
- Massé, E. and Drolet, M. (1999b) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem*, **274**, 16659-16664.
- Massé, E. and Drolet, M. (1999c) R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol*, **294**, 321-332.
- Miller, J. H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Neidhardt, F.C., Bloch, P.L. and Smith, D.F. (1974) Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol*, **119**, 736-747.
- Phoenix, P., Raymond, M.A., Massé, E. and Drolet, M. (1997) Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J Biol Chem*, **272**, 1473-1479.
- Qi, H., Menzel, R. and Tse-Dinh, Y.C. (1996) Effect of the deletion of the sigma 32- dependent promoter (P1) of the *Escherichia coli* topoisomerase I gene on thermotolerance. *Mol Microbiol*, **21**, 703-711.

- Schneider, D.A., Gaal, T and Gourse, R.L. (2002) NTP-sensing by rRNA promoters in *Escherichia coli* is direct. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 8602-8607.
- Squires, C.L., Greenblatt, J., Li, J., Condon, C. and Squires, C. (1993) Ribosomal RNA antitermination *in vitro*: requirement for Nus factors and one or more unidentified cellular components. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 970-974.
- Tsao, Y.P., Wu, H.-Y. and Liu, L.F. (1989) Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from *in vitro* studies. *Cell*, **56**, 111-118.
- Tse-Dinh, Y.-C. (1998) Bacterial and archeal type I topoisomerases. *Biochim Biophys Acta*, **1400**, 19-27.
- van Workum, M, van Dooren, S.J., Oldenburg, N., Molenaar, D., Jensen, P.R., Snoep, J.L. and Westerhoff, H.V. (1996) DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **20**, 351-360.
- Vogel, U. and Jensen, K.F. (1995) Effects of the antiterminator BoxA on transcription elongation kinetics and (p)ppGpp inhibition of transcription elongation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 18335-18340.
- Wang, J.C. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 430-440.
- Wassarman, K.M. and Storz, G. (2000) 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell*, **101**, 613-623.

- Westerhoff, H.V, O'Dea, M.H., Maxwell, A. and Gellert, M. (1988) DNA supercoiling by DNA gyrase. A static head analysis. *Cell Biophys*, **12**, 157-181.
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G. and Cashel, M. (1991) Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J Biol Chem*, **266**, 5980-5990.

Figure 1. Mechanisms for the formation of hypernegatively supercoiled plasmid DNA in *Escherichia coli topA* null mutants. a) Co-transcription-translation generates hypernegatively supercoiled plasmid DNA in accordance with the twin-domain model. Anchoring of the nascent peptide to the membrane completely blocks rotation of the transcribing RNA polymerase, thus efficiently promoting formation of negatively and positively supercoiled domains. The action of DNA gyrase on positive supercoiling in front of the moving RNA polymerase allows formation of such hypernegatively supercoiled plasmid DNA. b) Transcription-induced negative supercoiling promotes unwinding of the DNA strands behind the transcribing RNA polymerase. Nascent RNA can then reanneal with the template strand to initiate R-loop formation. The action of DNA gyrase in front of the moving RNA polymerase provides the driving force for R-loop elongation. Upon R-loop removal by RNase HI *in vivo*, or during plasmid extraction, hypernegatively supercoiled DNA is revealed. – and + are respectively negative and positive supercoiling. Arrows indicate the direction of transcription. On the right, DNA is hypernegatively supercoiled.

A. Membrane anchorage-dependent hypernegative supercoiling



B. R-loop-dependent hypernegative supercoiling

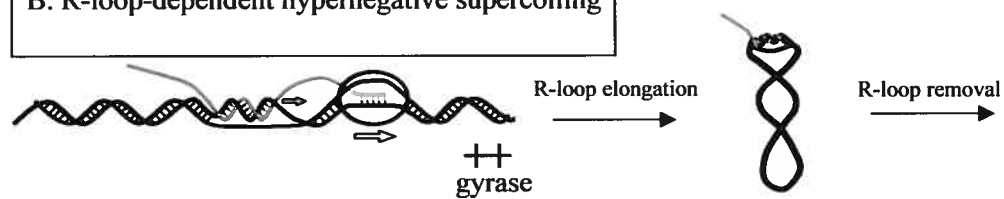
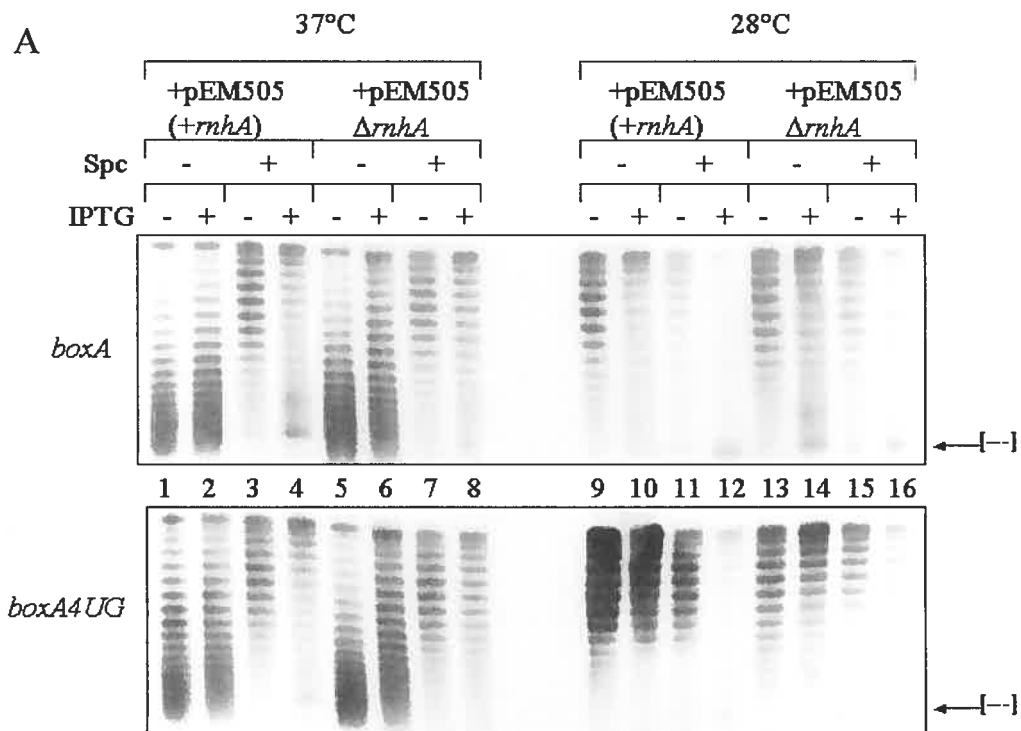


Figure 2. Effects of the *boxA* antitermination sequence on R-loop-dependent hypernegative supercoiling. RFM475 cells carrying a plasmid with either a wild-type (pMD306 Δ *lacI*^q) or a *boxA4UG* mutated (pMD315 Δ *lacI*^q) *boxA* sequence and pEM505 (+RNase HI) or pEM505 Δ *rnhA* (-RNase HI) were grown as described in Experimental Procedures except that LB was used instead of MOPS. Plasmid DNAs were extracted and analyzed by 1-D agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine (a). The presence (+Spc) or absence (-Spc) of spectinomycin at 400 μ g/ml is noted. When indicated, IPTG was added at a final concentration of 1 mM, five minutes before transferring the cells to 28⁰C. The gels were probed by *in situ* hybridization with a ³²P-labeled fragment of the *bla* gene from pBR322 obtained by PCR amplification. [---] indicates hypernegatively supercoiled plasmid DNA. Plasmid DNAs extracted from spectinomycin-treated IPTG-induced *rnhA*⁺ cells (the same samples used in lane 12 Fig. 2a) were analyzed by 2-D agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine (b).



B

boxA

boxA4UG

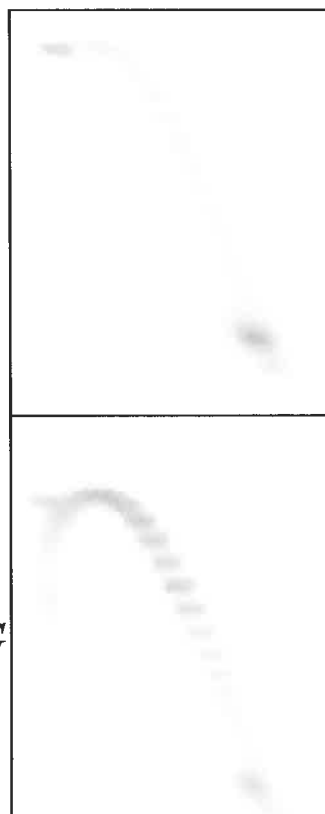
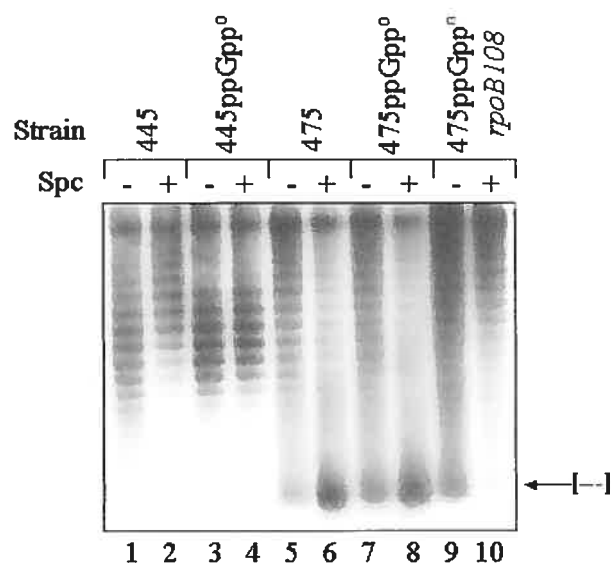
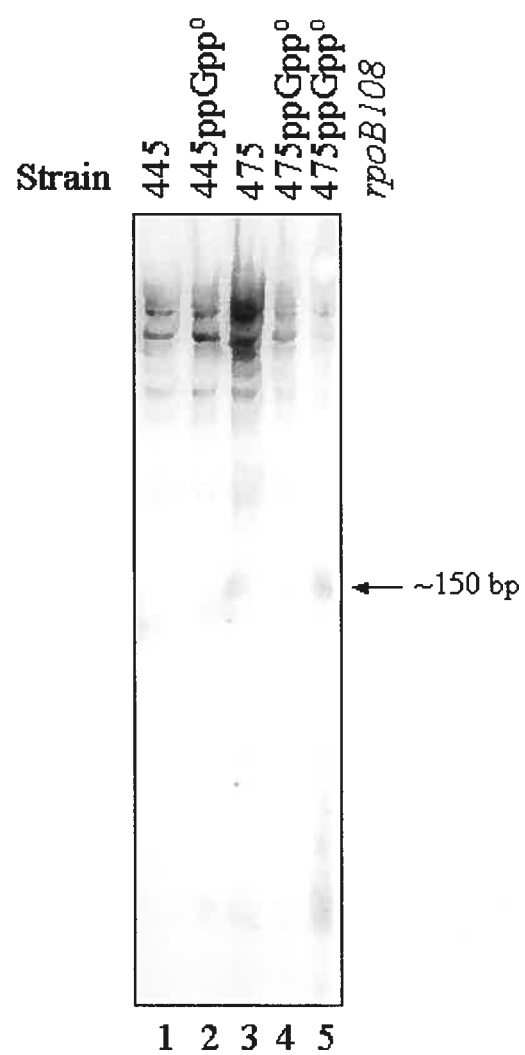


Figure 3. Effects of RNA polymerase modifications on membrane anchorage- and R-loop-dependent hypernegative supercoiling. Various strains carrying pBR322 were grown as described in Experimental Procedures. a) Plasmid DNAs were extracted and analyzed by electrophoresis on a 0.8 % agarose gel containing chloroquine. Plasmids shown here were extracted from cultures incubated at 28°C in the presence (+) or absence (-) of spectinomycin (Spc) at 400 µg/ml. The gel was probed by *in situ* hybridization with a ³²P-labeled fragment of the *bla* gene from pBR322 obtained by PCR amplification. [---] indicates hypernegatively supercoiled plasmid DNA. In b), culture samples of 2 ml were taken and total RNA was extracted as described in Experimental Procedures. Ten µg of RNA from cultures exposed to spectinomycin (+ Spc) at 28°C were loaded on a denaturing polyacrylamide gel for Northern blot analysis. The membrane was probed with a 55-mer oligonucleotide that hybridizes with the 5' region of the pBR322 *tetA* gene.

A



B



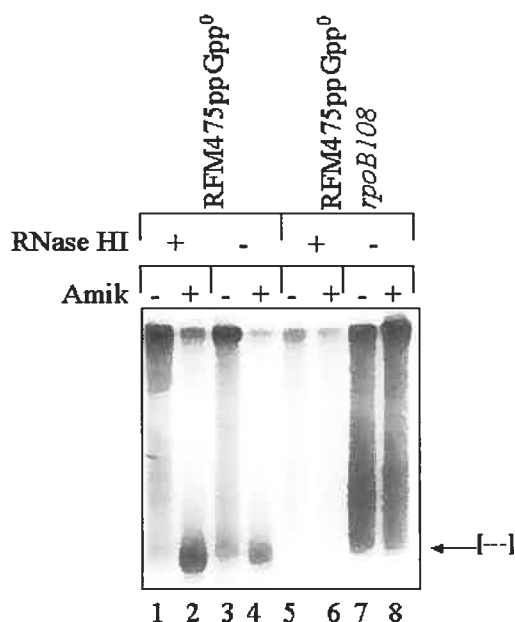
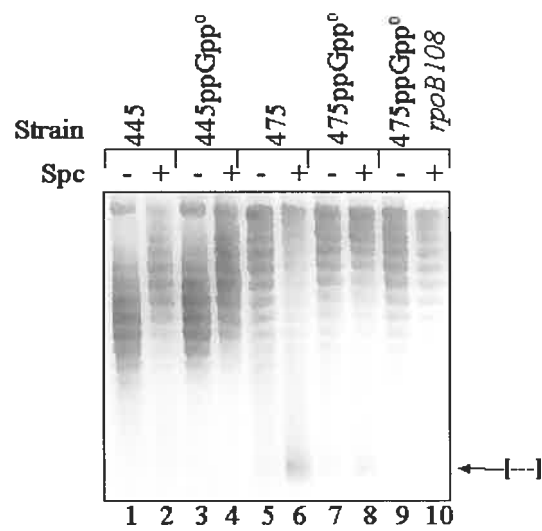


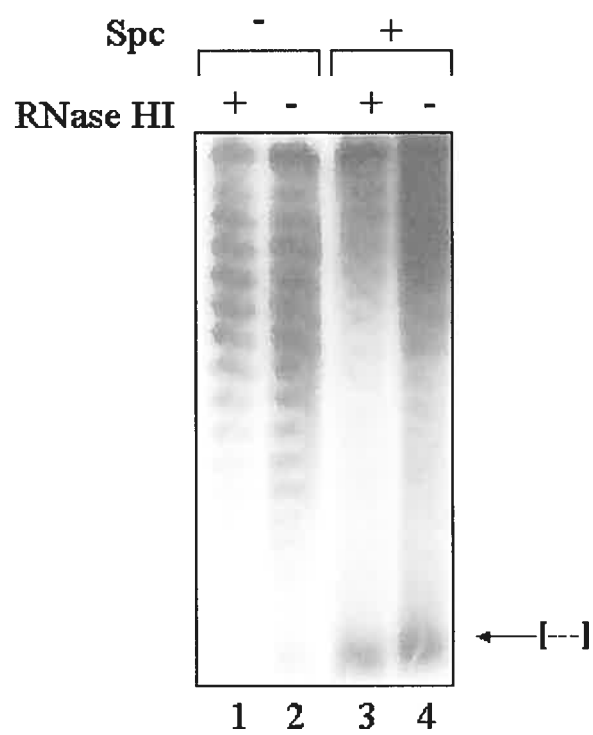
Figure 4. The effect of the *rpoB108* mutation on R-loop-dependent hypernegative supercoiling is not restricted to ColE1-type plasmids. Cells carrying pEM301 and pSK760 (+RNase HI) or pSK762c (-RNase HI) were grown as described in Experimental Procedures. Plasmid DNAs were extracted and analyzed by electrophoresis on a 0.8 % agarose gel containing chloroquine. Plasmids shown here were extracted from cultures incubated at 28°C in the presence (+) or absence (-) of amikacin at 400 µg/ml. The dried gel was probed by *in situ* hybridization with a ³²P-labeled fragment of the *spc* gene from pEM301 obtained by PCR amplification. [---] indicates hypernegatively supercoiled plasmid DNA. For unknown reasons, the yield of pEM301 recovery from the *rpoB108* strain was always very low when RNase HI was overproduced.

Figure 5. Spectinomycin stimulates R-loop-dependent hypernegative supercoiling due to transcription of an untranslatable *tetA* gene. Various strains carrying pBR322 Δ *tet5* ' in a) or RFM475 cells carrying pBR322 Δ *tet5* ' and pEM001 (+RNase HI) or pEM003 (-RNase HI) in b), were grown as described in Experimental Procedures. Plasmid DNAs were extracted from cultures incubated at 28⁰C and analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel containing chloroquine. The dried gel was probed by *in situ* hybridization with a ³²P-labeled fragment of the *bla* gene from pBR322 obtained by PCR amplification. [---] indicates hypernegatively supercoiled plasmid DNA. Spc indicates the presence (+) or absence (-) of spectinomycin at 400 μ g/ml.

A



B



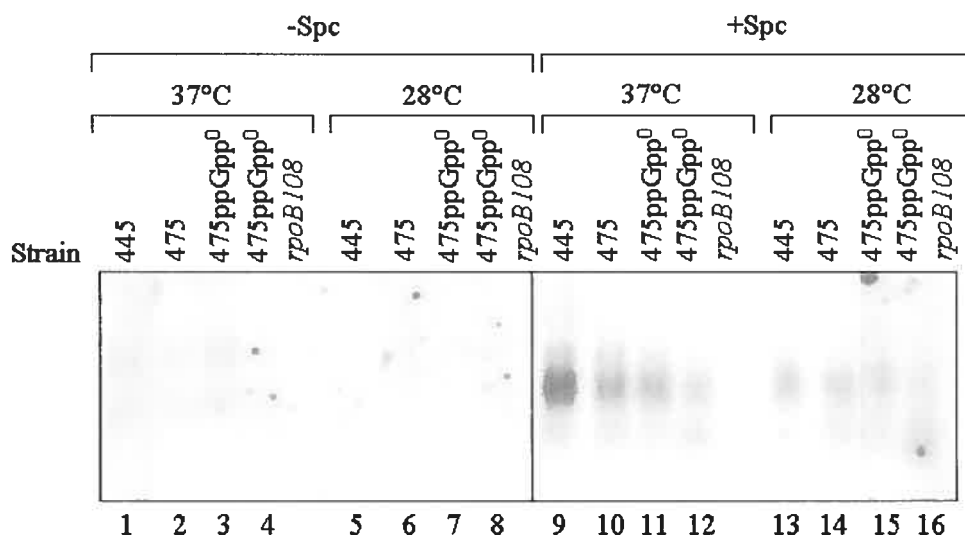


Figure 6. Spectinomycin stabilizes *tetA* mRNAs. Ten μ g of RNA from cultures grown for Fig. 3 were loaded on a denaturing agarose gel for Northern blot analysis. After transfer of the RNA, the membrane was probed with a 55-mer oligonucleotide which hybridizes with the 5' region of the pBR322 *tetA* gene. Bottom panel shows a photograph of the ethidium bromide stained agarose gel.

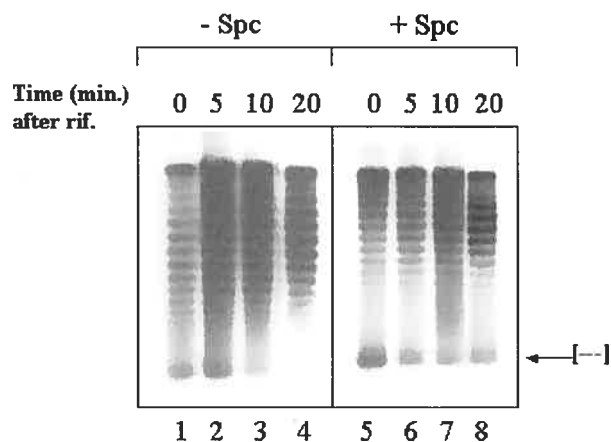


Figure 7. Spectinomycin stabilizes hypernegatively supercoiled DNA. RM475 cells carrying pBR322 were grown at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.4 at which time the cultures were split and spectinomycin was added (+) or not (-) at a concentration of 400 µg/ml. After a one hour incubation period at 28°C, rifampicin was added at 250 µg/ml and plasmids were extracted at the indicated times after rifampicin addition. Plasmid DNAs were extracted and analyzed by electrophoresis on a 0.8 % agarose gel containing chloroquine. The dried gels were probed by *in situ* hybridization with a ³²P-labeled fragment of the *bla* gene from pBR322 obtained by PCR amplification. [---] indicates hypernegatively supercoiled plasmid DNA.

Table 1. List of *E. coli* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source or ref.
RFM445	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , <i>gyrB221</i> (cou ^R), <i>gyrB203</i> (Ts), Δ <i>lac74</i>	Drolet <i>et al.</i> , 1995
RFM475	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , <i>gyrB221</i> (cou ^R), <i>gyrB203</i> (Ts), Δ (<i>topA cysB</i>)204, Δ <i>lac74</i>	Drolet <i>et al.</i> , 1995
RFM445ppGpp ⁰	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , <i>gyrB221</i> (cou ^R), <i>gyrB203</i> (Ts), Δ <i>relA251::km</i> , Δ <i>spoT207::cat</i> , Δ <i>lac74</i>	This work
RFM475ppGpp ⁰	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , <i>gyrB221</i> (cou ^R), <i>gyrB203</i> (Ts), Δ (<i>topA cysB</i>)204, Δ <i>relA251::km</i> , Δ <i>spoT207::cat</i> , Δ <i>lac74</i>	This work
RFM475ppGpp ⁰ <i>rpoB108</i>	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , <i>gyrB221</i> (cou ^R), <i>gyrB203</i> (Ts), Δ (<i>topA cysB</i>)204, Δ <i>relA251::km</i> , Δ <i>spoT207::cat</i> , Δ <i>lac74</i> , <i>rpoB108</i>	This work

3. Discussion

*Isolement de supresseurs multicopie de mutations $\Delta topA$ chez *E. coli**

Les travaux précédant cette étude sur l'isolement de supresseurs multicopie de mutations *topA* avaient permis de déterminer que l'une des fonctions majeures de la topoisomérase I chez *E. coli* était d'inhiber la formation de R-loops, soit en relaxant le surenroulement négatif généré par la transcription, soit en déstabilisant le R-loop une fois formé. En effet, la surproduction de RNase HI qui est une endoribonucléase spécifique à l'ARN impliqué dans un hybride ARN-ADN *in vivo*, permet de compléter partiellement la croissance des mutants *topA* jusqu'à une température de 27°C, soit une température à laquelle la gyrase chez les mutants thermosensibles employés, retrouve des niveaux d'activité sauvages (Drolet *et al.*, 1995). Ainsi, un modèle avait été proposé en fonction des connaissances acquises selon lequel la topoisomérase I et la RNase HI sont des régulateurs négatifs de la formation de R-loops alors que la gyrase, en servant de force motrice pour le complexe transcriptionnel, favorise la formation et l'élongation de ces structures (Drolet *et al.*, 1994). Afin de caractériser des protéines autres que la topoisomérase I et la RNase HI qui sont des régulateurs négatifs de la formation de R-loops, nous avons tenté d'isoler des supresseurs multicopie d'une mutation *topA* en faisant appel à un système de clonage *in vivo* (Noël & Drapeau, 1986).

La technique de clonage *in vivo* utilisée dans cette étude fait appel à un transmise appelé le pRRA101 et est décrite en détail dans Groisman *et al.*, 1984 et dans Noël & Drapeau, 1986. Ce transmise est une construction qui possède, entre autres, une origine de répllication de type ColE1 (provenant du plasmide pBR322) et une copie incomplète du génome du phage Mu (mini-Mu). Pour le clonage *in vivo*, ce transmise a été introduit dans une souche réceptrice sauvage lysogène pour Mu_{cts}. Ce phage « assistant » sert à compléter les fonctions absentes du mini-Mu mais il possède une mutation dans le gène codant pour le répresseur (Muc) qui le rend thermosensible. Le répresseur empêche normalement l'intégration et la répllication d'autres phages Mu dans le

chromosome bactérien lorsqu'il est exprimé par le phage « résident ». Ainsi, lorsque les cellules sont exposées à 30°C, Mucts empêche l'intégration et réplication du Mini-Mu et ce dernier est maintenu sous forme d'épisome. Une incubation des cellules à 44°C cause l'inactivation du répresseur et le mini-Mu peut alors s'intégrer dans le chromosome et se répliquer. Le cycle lytique peut alors être initié en incubant les cellules à 37°C. L'encapsidation de l'ADN phagique se fait par un mécanisme par tête pleine. Une région d'ADN pouvant aller jusqu'à 39 kb entre deux génomes phagiques peut alors être encapsidée. Un lysat phagique est alors préparé et utilisé pour transduire une souche réceptrice RFM480 ($\Delta topA$) Mu^+ . Le phage «résident» ayant un répresseur Muc sauvage (Mu^+), il empêchera l'intégration du transmise dans le chromosome bactérien. Le transmise sera donc maintenu sous forme d'épisome. Les cellules qui incorporent un transmise qui porte un gène permettant une complémentation de la croissance du mutant $\Delta topA$ donneront naissance à des colonies plus grosses. Celles-ci seront conservées et leurs transmeses peuvent être analysés par criblage d'une banque génomique.

Les résultats de cette étude pouvaient potentiellement confirmer que la fonction majeure de la topoisomérase I est d'empêcher la formation de R-loops ou bien, ils permettraient d'identifier de nouvelles fonctions de cette dernière chez la bactérie. Tel que prévu, nous avons isolé la topoisomérase I et la RNase HI par ce système de criblage, soit deux supresseurs multicopie bien connus de mutations *topA* (voir tableau II, p. 65; Drolet *et al.*, 1995). La topoisomérase III et la sous-unité GyrA de la gyrase (souche DM800) sont les seuls autres supresseurs multicopie isolés par cette méthode. Il a été longtemps été suggéré que la souche DM800 possède une mutation compensatoire additionnelle à celle connue dans le gène *gyrB* et qui a pour conséquence d'améliorer la croissance des mutants *topA* (DiNardo *et al.*, 1982). Des travaux récents de notre laboratoire ont confirmé cette hypothèse et cela explique probablement mieux pourquoi *gyrA* a été isolée dans cette étude (J. Douville & M. Drolet, non publié). Il est à souligner que *gyrA* est le seul supresseur multicopie isolé à toutes les températures d'incubation testées.

L'importance de ce résultat et l'efficacité de *gyrA* en tant que suppresseur de mutations *topA* à basse température sera discutée davantage plus loin.

Si l'on prend en considération les limites de cette méthode de clonage *in vivo*, il est bien entendu peu probable que les protéines codées par des gènes faisant partie d'opérons de tailles considérables soient isolées avec ce système. Il en est de même avec des protéines composées de plusieurs sous-unités dont les gènes sont situés à des distances assez importantes les uns des autres, et qui ne peuvent être isolés sur un seul fragment d'ADN. Il est à noter que la topoisomérase IV dont la surexpression améliore considérablement la croissance des mutants $\Delta topA$ (Raji *et al.*, 1985; Dorman *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1990; Free & Dorman, 1994; Drolet *et al.*, 1995; McCairn *et al.*, 1995) n'a pas été isolée dans cette étude. Rappelons que la topoisomérase IV est formée de deux sous-unités et il est fort probable que la distance entre les gènes *parC* et *parE* soit la raison de son absence des protéines criblées.

Caractérisation de la topoisomérase III en tant que suppresseur multicopie de mutations $\Delta topA$ de E. coli in vivo

Les résultats des expériences *in vivo* et *in vitro* effectuées avec la topoisomérase III dans cette étude et l'effet positif de la surexpression de cette enzyme sur la croissance des mutants *topA* qui surproduisent la RNase HI (figure 1, p. 67) nous avaient amenés à déduire que la prévention des R-loops n'était pas simplement l'une des fonctions, mais plutôt la fonction principale de la topoisomérase I chez la bactérie. Il n'avait pas été possible de tirer ces conclusions préalablement à cette étude parce que la surproduction de la RNase HI ne corrigeait pas les problèmes de croissance des mutants $\Delta topA$ à basse température (Drolet *et al.*, 1995; Massé & Drolet, 1999c). Le problème des mutants $\Delta topA$ à basse température est complexe et sera discuté davantage plus loin.

Cette conclusion sur la fonction de la topoisomérase I dans la prévention des R-loops est soutenue par des études d'exclusion de marqueur avec un allèle *topA* nul et un marqueur co- transmissible à proximité de *topA* (Drolet *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent qu'il est possible de co- transduire un allèle *topA* muté dans des cellule sauvage qui surproduisent simultanément la RNase HI et la topoisomérase III, et ce, à une fréquence comparable à celle observée lorsque *topA* est co- transduit dans des cellules qui possèdent déjà des mutations compensatoires dans les gènes *gyr*, comme chez la souche DM800. Il est par contre clair que ces cellules croissent moins bien que des cellules sauvages ou des transductants obtenus chez des souches avec des mutations compensatoires dans les gènes *gyr*, mutations qui ont pour résultat de réduire le niveau de surenroulement global (Pruss *et al.*, 1982). Il est possible que les niveaux de topoisomérase III produits dans ces conditions ne soient pas suffisants ou que le niveau de surenroulement global soit trop élevé dans ces cellules pour assurer une croissance optimale, tel que suggéré précédemment pour expliquer les problèmes de croissance des mutants *topA* (Drlica, 1992).

Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'il est difficile de surproduire la topoisomérase III *in vivo* à des niveaux élevés puisque nous avons remarqué que cette dernière devient toxique pour les cellules (absence de croissance), quel que soit leur génotype (résultats non montrés). Dans cette étude, nous avons fait des compromis dans les niveaux de topoisomérase III surproduits afin d'observer une correction adéquate des problèmes de croissance des mutants *topA*. Cette toxicité a récemment été attribuée à une interaction de la topoisomérase III avec la PBP (« Penicillin- Binding Protein ») située dans la membrane des cellules (R. J. DiGate, communication personnelle). Une mutation ponctuelle qui empêche cette interaction et qui n'altère vraisemblablement pas l'activité de relaxation de la topoisomérase III permet de surproduire cette dernière à des niveaux supérieurs à ceux obtenus jusqu'à présent et élimine le problème de toxicité (R. J. DiGate, communication personnelle). Entre nos mains, lorsque cette topoisomérase III mutée est surproduite chez les mutants $\Delta topA$ de *E. coli*, cette dernière semble

corriger les problèmes de croissance de ces mutants à basse température à des niveaux bien plus élevés que ceux rapportés ici (S. Broccoli & M. Drolet, non publié). La surproduction simultanée de cette topoisomérase III mutée et de la RNase HI reste à être évaluée. Il serait intéressant de voir si l'effet synergique sur la croissance des mutants *topA* est encore présent à basse température dans ces conditions. Des expériences plus poussées restent à être effectuées afin de vérifier les propriétés de cette topoisomérase III modifiée. Il serait également intéressant de tenter de transduire un allèle $\Delta topA$ dans des cellules sauvages qui ne surproduisent que cette topoisomérase III mutée. Notons qu'il est impossible de transduire un allèle $\Delta topA$ chez des cellules sauvages (sans mutations *gyr* compensatoires) qui surproduisent seulement soit la RNase HI, soit la topoisomérase III sauvage. Ceci est possiblement dû au fait que la RNase HI ne peut agir qu'une fois le R-loop formé et que la topoisomérase III sauvage qui peut vraisemblablement prévenir la formation des R-loop, ne peut être surproduite à des niveaux adéquats sans devenir toxique. La combinaison des deux est donc optimale dans ces conditions pour permettre l'inactivation de *topA* chez des cellules qui ne possèdent pas de mutations *gyr* compensatoires.

Comparaison des activités de relaxation des topoisomérases I et III sur divers substrats in vitro

Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent donc que la topoisomérase I est la meilleure candidate pour empêcher la formation des R-loops *in vivo*, probablement parce qu'elle relaxe efficacement le surenroulement négatif généré par la transcription. Rappelons que la topoisomérase III a une spécificité de substrat beaucoup plus élevée que celle de la topoisomérase I (DiGate & Marians, 1988) et qu'au fur et à mesure que ce substrat est relaxé, la compétence de ces enzymes à relaxer l'ADN est progressivement réduite. Ceci est mis en évidence lors des essais de relaxation *in vitro* dans cette étude. Ainsi, la topoisomérase I est plus efficace que la topoisomérase III dans la relaxation *in vitro* du surenroulement négatif généré par la transcription (voir figure 3, p. 70) alors que

l'inverse est vrai lorsque le substrat employé est un R-loop (voir figure 5, p. 72). Il est également possible que la topoisomérase I soit plus efficace dans la relaxation du surenroulement négatif généré par la transcription parce qu'elle interagit directement avec l'ARN polymérase. Tel que décrit précédemment, les études de Yigit et Reznikoff (1998, 1999) avaient suggéré qu'une telle interaction pouvait exister et des études récentes ont confirmé une association entre le domaine C-terminal de la topoisomérase I bactérienne et l'ARN polymérase (Cheng *et al.*, 2003a). Il est intéressant de noter qu'à l'époque des études visant à étudier l'interaction entre la topoisomérase I de *E. coli* et la transposase Tn5, il avait été conclu que la topoisomérase I était titrée par la transposase et que les conséquences de ce titrage étaient semblables à celles observées lors de problèmes de ségrégation des chromosomes (filamentation, ségrégation aberrante du nucleoïde et formation de cellules anucléées) (Weinreich *et al.*, 1994; Yigit & Reznikoff, 1997; Yigit & Reznikoff, 1998). Puisque la topoisomérase I est incapable d'effectuer la décaténation de deux molécules circulaires interreliées *in vitro* (Hiasa *et al.*, 1994; Wang, 1996; Wang, 2002), il était difficile de concevoir comment l'absence de cette dernière puisse avoir des répercussions aussi importantes sur les étapes finales de la réplication du chromosome chez la bactérie. Actuellement, la meilleure façon d'expliquer ces observations est de considérer le fait que ces cellules sont sauvages et ne possèdent donc pas de mutations *gyr* compensatoires. Le titrage, même partiel, de la topoisomérase I peut donc occasionner une augmentation du surenroulement global dans ces cellules, ce qui peut nuire à la partition des chromosomes et à la réalisation des étapes finales de la réplication (Nordström & Dasgupta, 2001).

Nos résultats nous permettent donc de conclure que la topoisomérase III peut, du moins occasionnellement se comporter comme une topoisomérase de type IA classique et relaxer l'ADN surenroulé négativement pourvu que des régions d'ADN simple brin soient exposées. Malgré le fait que nos résultats suggèrent que le rôle de la topoisomérase III dans la prévention de R-loops et dans la stimulation de la croissance des mutants $\Delta topA$ soit direct, il n'est pas

possible à ce stade d'éliminer la possibilité que la surproduction de la topoisomérase III affecte l'expression d'un gène qui serait à son tour un régulateur de la formation de R-loops. Puisque la topoisomérase III est peu abondante (1 à 10 copies par cellule; DiGate & Marians, 1988), il est peu probable que sa fonction principale soit au niveau de la transcription puisque la transcription est l'événement génétique le plus fréquent dans la cellule. Les résultats de cette étude permettent donc d'adresser la fonction de la topoisomérase I chez la bactérie mais ne permettent aucunement de conclure sur la fonction cellulaire de la topoisomérase III. Puisque le R-loop est un « hot-spot » de relaxation pour la topoisomérase III, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que certains phénotypes des mutants *topA* nuls soient le résultat d'une déplétion de topoisomérase III. Des études plus poussées devront être réalisées avant que nous puissions conclure quoique ce soit sur la (les) fonction(s) de la topoisomérase III chez *E. coli*.

*Conséquences des R-loops pour la réplication chez les mutants $\Delta topA$ de *E. coli**

Tel que décrit dans la revue de la littérature, les R-loops jouent des rôles variés dans la réplication. Le cSDR (« constitutive Stable DNA Replication ») est connu comme étant une forme unique de réplication stable et constitutive qui est induite chez les mutants *rnhA* où des R-loops formés à divers endroits sur le chromosome peuvent servir d'origines alternatives de réplication (Kogoma, 1997). Le cSDR seul peut vraisemblablement soutenir la réplication du chromosome puisqu'une délétion complète de l'origine *oriC* est possible chez les mutants *rnhA* (Kogoma, 1978; Kogoma *et al.*, 1981; Kogoma & von Meyenburg, 1983). Puisque la formation de R-loops est la conséquence majeure de l'absence de *topA* chez *E. coli*, il était logique de croire que le cSDR pouvait être induit chez ces mutants. À notre surprise, les résultats préliminaires d'expériences effectuées dans notre laboratoire semblent indiquer que ce phénomène n'existe pas chez les mutants $\Delta topA$ employés, du moins dans nos conditions expérimentales (M.-A. Raymond & M. Drolet, non publié).

D'autres études suggèrent que le R-loop est une structure qui peut bloquer la progression des fourches de réplication (Viguera *et al.*, 2000). En fait, l'hélicase DnaB qui est l'hélicase principale associée à fourche de réplication, est incapable de dissocier un hybride ADN-ARN *in vitro* (Viguera *et al.*, 2000). Il a été estimé que plus de la moitié des fourches de réplication issues de *oriC* sont arrêtées avant d'atteindre la région *Ter* du chromosome (Kuzminov, 1999). Peu importe la cause de ces arrêts, ils se traduisent généralement par des cassures double brin dans l'ADN et les fourches de réplication sont subséquemment réparées par l'assemblage d'un primosome soit sur un intermédiaire de la recombinaison homologue, soit sur une autre structure qui expose une région d'ADN simple brin. Étant donné que le R-loop peut à la fois induire et bloquer la réplication, il est possible (quoique peu probable) que des facteurs existent chez la bactérie qui contribuent à la régulation de la formation des R-loops afin de déterminer à quel moment ces structures sont nécessaires pour la survie de la cellule et dans quelles circonstances elles doivent être éliminées, sans quoi elles pourraient avoir des conséquences néfastes pour la croissance.

Une façon alternative de consolider toutes ces observations est de considérer le fait que le cSDR n'est pas un mécanisme comme tel pour induire la réplication dans des conditions bien déterminées, mais qu'il soit plutôt une conséquence indirecte de la formation de R-loops chez ces cellules. En d'autres mots, la formation de R-loops qui est induite chez les mutants *rnhA* pourrait causer un arrêt de la réplication issue de *oriC* basé sur l'observation qu'ils peuvent bloquer l'hélicase DnaB (Viguera *et al.*, 2000). Dans cette optique, nous pourrions expliquer l'absence de cSDR chez les mutants *topA* thermosensibles employés dans notre laboratoire par le fait que ces cellules doivent être transférées à 28°C afin que la gyrase puisse retrouver des niveaux d'activité semblables aux niveaux sauvages et que nous puissions donc étudier les vraies conséquences de la perte de *topA* pour *E. coli* (Drolet *et al.*, 1995). Suite au transfert à 28°C, nous avons observé que la réplication issue de *oriC* est temporairement arrêtée chez ces mutants *topA*, probablement en raison d'une inhibition de la synthèse protéique

(Baaklini *et al.*, soumis pour publication). Même si des R-loops sont formés immédiatement après le changement de température, l'absence de collision entre une fourche de réplication et ces structures pourrait se traduire par une absence de cSDR. D'ailleurs, des études sur les mutants *rnhA* ont démontré que ces derniers sont sensibles à la richesse du milieu de croissance (Torrey *et al.*, 1984). On peut expliquer cette sensibilité par le fait qu'en milieu riche, jusqu'à six fourches de réplication ont été comptées sur le chromosome (Kogoma, 1997). Un nombre accru de fourches de réplication peut potentiellement causer un plus grand nombre de collisions entre ces dernières et des R-loops résultant en une fragmentation du chromosome et la mort cellulaire.

Il est intéressant de noter que nous avons récemment obtenu des résultats préliminaires qui nous laissent supposer que la transcription d'une région de l'opéron *rrnB* sur un plasmide (dont la réplication se poursuit même en absence de synthèse protéique) peut causer des arrêts de fourches de réplication qui se traduisent par une accumulation d'intermédiaires de réplication du plasmide (voir annexe, figure 1A, p. 193). Lorsque le fragment est transcrit dans son orientation inversée, ces blocages semblent être absents (voir annexe, figure 1B, p.194). Il avait été démontré que des R-loops étaient formés préférentiellement lorsque le fragment *HindIII* était transcrit dans son orientation physiologique et il avait été suggéré que la stabilité des hybrides pouvait être un facteur important dans l'accumulation de ces structures (Phoenix *et al.*, 1997; Massé *et al.*, 1997). Nos résultats préliminaires indiquent que la présence des intermédiaires représentant des arrêts de fourches de réplication sur ce plasmide, dépend premièrement de la transcription du fragment (comparer +/- IPTG, figure 1A de l'annexe, p. 193) et deuxièmement, de l'orientation de sa transcription (comparer + IPTG de figure 1A et + IPTG de figure 1B, annexe, pp. 193 et 194). Puisque la sensibilité de ces blocages à la RNase HI n'a pas encore été évaluée, il est difficile à ce stade d'affirmer que des R-loops soient exclusivement la cause de ces arrêts de fourches de réplication.

Alternativement, il est possible que les fourches de réplication ne soient pas directement bloquées par la présence de R-loops sur la matrice, mais qu'elles s'effondrent suite à une collision avec une ARN polymérase bloquée pendant l'élongation à cause de la formation de R-loops. Une étude récente de notre laboratoire a confirmé que des problèmes d'élongation lors de la transcription des opérons ribosomaux ont lieu chez les mutants *topA* et que ces blocages sont sensibles à l'action de la RNase HI (Hraiky *et al.*, 2000). Il est intéressant de noter que ces blocages ont été cartographiés dans une région où la formation de R-loops a été démontrée *in vivo* et *in vitro* (Phoenix *et al.*, 1997; Massé *et al.*, 1997). Quant aux fourches de réplication, il est connu que ces dernières peuvent facilement traverser des régions fortement transcrites si la transcription et la réplication sont codirectionnelles (Liu & Alberts, 1995). Si par contre elles se dirigent dans des directions opposées, la fourche de réplication semble éprouver des difficultés à déplacer l'ARN polymérase et à poursuivre son chemin. Les conséquences d'une telle rencontre si l'ARN polymérase est bloquée par une structure particulière comme un R-loop n'ont pas été abordées à ce jour. Puisque les problèmes d'élongation de la transcription semblent être fréquents chez les mutants *topA*, il est possible que le cSDR soit tout simplement le résultat de la réparation de fourches de réplication effondrées suite à des collisions entre ces dernières et des complexes de transcription dont la progression normale est bloquée par la présence de R-loops.

Dans le même ordre d'idées, l'une des observations associées au vieillissement chez les levures est la formation de cercles extrachromosomiques formés d'ADN ribosomal (Sinclair & Guarente, 1997). Les 150 copies de l'ADN ribosomal chez la levure *S. cerevisiae* sont organisées en tandems répétés sur le chromosome XII (Petes, 1979). La liaison de la protéine Fob1 à l'ADN dans la région non transcrite appelée RFB (« Replication Fork Blockage ») permet de freiner la fourche de réplication afin que cette dernière ne se dirige pas vers la région fortement transcrite où les ARN polymérases progressent dans la direction opposée à la réplication (Takeuchi *et al.*, 2003). Chez les mutants *fob1*, la

recombinaison qui mène à l'excision de l'ADN ribosomal afin de former ces cercles extrachromosomiques pourrait être le résultat des cassures double brin induites par des collisions entre les polymérases ADN et ARN (Takeuchi *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que le chromosome de *E. coli* est organisé de sorte que la transcription et la réplication soient pour la plupart du temps, codirectionnelles, particulièrement au niveau de l'ADN ribosomal qui est fortement transcrit. De plus, la terminaison de la réplication implique une collision entre l'ADN polymérase et des complexes nucléoprotéiques formés des protéines Tus liées aux sites *Ter* du chromosome, empêchant ainsi les fourches de réplication de progresser vers des régions où elles seraient en danger d'entrer en collision frontale avec des ARN polymérases. Le vieillissement prématuré associé à l'excision de l'ADN ribosomal a également été observé chez les mutants $\Delta top1$ $top2(ts)$ de *S. cerevisiae* et il a été proposé que la non- relaxation du surenroulement négatif généré par la transcription serait la cause principale de cette hyper- recombinaison chez *S. cerevisiae* (Trigueros & Roca, 2002). Il est possible que l'accumulation de surenroulement négatif généré par la transcription perturbe la liaison de Fob1 avec l'ADN dans la région RFB mais un autre mécanisme à considérer pour expliquer l'accumulation de cercles d'ADN ribosomal pourrait impliquer la formation de R-loops. Ces hypothèses restent à être testée expérimentalement.

*La topoisomérase III corrige certains phénotypes des mutants $\Delta topA$ de *E. coli* en relaxant le surenroulement local (induit par la transcription)*

Il est clair que la surproduction de topoisomérase III n'altère aucunement le surenroulement global chez les mutants *topA* employés dans cette étude (figure 4, p. 71). Tel que décrit précédemment, ceci s'explique par le fait que cette dernière requière des régions d'ADN simple brin pour son activité (DiGate & Mariani, 1988). Le niveau de surenroulement global présenté par les cellules n'est donc pas un substrat favorable à l'action de cette enzyme. Les résultats obtenus dans cette étude lorsque la topoisomérase III est surproduite nous permettent de

soutenir encore une fois que la fonction principale de la topoisomérase I est au niveau de la transcription (surenroulement local) et non pas au niveau de la régulation du surenroulement global comme on l'a longtemps cru. Les problèmes d'élongation de la transcription rapportés chez les mutants *topA* lors de la transcription des opérons ribosomaux se traduisent par une surinitiation de la transcription de l'ARN ribosomal chez les mutants *topA* et une accumulation d'ARN courts de longueurs variables résultant probablement du blocage des ARN polymérases par des R-loops (Hraiky *et al.*, 2000). Les blocages retrouvés en 5' et en 3' des gènes des opérons ribosomaux sont généralement corrigés par la surproduction de la RNase HI. La surproduction de la topoisomérase III quant à elle, corrige les problèmes qui sont en 3' (C. Hraiky & M. Drolet, non publiés). Ceci soutient encore une fois le rôle de cette topoisomérase dans le surenroulement local puisque les signaux en 3' reflètent les problèmes d'élongation de la transcription alors que ceux retrouvés en 5' suggèrent davantage des difficultés au niveau de l'initiation de la transcription.

*La topoisomérase IV est un supresseur multicopie efficace de mutations $\Delta topA$ de *E. coli*, même à basse température*

Tel que mentionné dans la revue de littérature, il est impossible de transduire un allèle $\Delta topA$ dans des souches $\Delta rnhA$, même si ces dernières possèdent déjà des mutations compensatoires dans les gènes *gyr*. Nous avons trouvé que cette combinaison est possible si la topoisomérase III sauvage est surproduite. Nous avons donc construit un mutant $\Delta topA \Delta rnhA$ conditionnel où l'expression du gène *topB* présent sur un plasmide peut être induite par l'ajout d'IPTG. Nous avons trouvé qu'en absence d'IPTG, ces cellules forment de très longs filaments dont la distribution du matériel génétique est complètement aberrante (voir annexe, figure 2, p. 195). Lorsque la surproduction de la topoisomérase III est induite, le problème de filamentation est corrigé et l'ADN est distribué normalement (résultats non montrés). Lors de l'extraction des plasmides afin d'évaluer la formation d'hypersurenroulement par ces cellules,

nous avons noté que le surenroulement global des plasmides extraits de cette souche était anormalement relaxé, que la topoisomérase III soit surproduite ou non (voir annexe, figure 3, 196). Puisqu'il est connu que les mutants *topA* acquièrent des duplications dans la région *tolC* du chromosome qui comprend les gènes *parC* et *parE* (Dorman *et al.*, 1989), nous avons pensé que la topoisomérase IV pouvait être surexprimée chez ces mutants, résultant en une baisse importante du surenroulement global. Il a été démontré que l'activité de la topoisomérase IV est temporelle puisque ses deux sous-unités ParC et ParE sont associées à la fourche de réplication et au septum de division respectivement, et que l'activation de la topoisomérase IV n'a lieu qu'à la toute fin de la réplication lorsque les deux sous-unités se rejoignent (Espeli *et al.*, 2003). Pour que l'activité topoisomérase IV soit présente tout le long du cycle cellulaire, il faut vraisemblablement la surproduire afin que suffisamment de sous-unités ParC et ParE soient libres dans le cytoplasme pour former l'hétérotétramère actif.

Nous avons vérifié cette hypothèse en effectuant des analyses par Western avec des anticorps spécifiques à ParC ou à ParE. Comme nous le voyons dans la figure 4 de l'annexe (p. 197), il semblerait que les sous-unités de la topoisomérase IV soient surproduites chez le mutant double $\Delta topA \Delta rnhA$ conditionnel. Cette baisse du surenroulement global due à une surproduction de l'activité topoisomérase IV a pour conséquence de réduire considérablement la quantité d'hypersurenroulement des plasmides extraits de ces cellules (voir l'annexe, figure 3, p. 196). La filamentation du double mutant $\Delta topA \Delta rnhA$ conditionnel ne semble donc pas liée à l'accumulation d'ADN hypersurenroulé comme tel (voir annexe, figure 3, p. 196). Parce que la surexpression de la topoisomérase III (et non celle de la topoisomérase IV par amplification du locus *tolC*) corrige le problème de ségrégation des chromosomes éprouvées par ces cellules, l'explication la plus logique serait de considérer le fait que des R-loops sont formés de manière généralisée dans cette souche et que la topoisomérase III, en empêchant leur formation ou en les relaxant dès qu'ils sont formés, prévient les

problèmes associés à l'accumulation de ces structures (par exemple, l'arrêt des fourches de réplication suite à des collisions de ces dernières avec des R-loops).

*Mécanismes connus de la formation de plasmides hypersurenroulés négativement chez les mutants $\Delta topA$ de *E. coli**

Des plasmides hypersurenroulés négativement ont été isolés chez les mutants *topA* pour la première fois vers la fin des années '80 et la formation de ces derniers a par la suite été attribuée à la co- transcription/traduction de gènes plasmidiques comme *tetA* dont le produit est ancré à la membrane cellulaire. Le mécanisme de formation de l'hypersurenroulement négatif a été expliqué en fonction du « Twin- Domain Model » de Liu et Wang (Liu & Wang, 1987). Selon le modèle, l'ancrage à la membrane du peptide naissant empêche toute rotation du complexe transcriptionnel et en absence d'activité topoisomérase I, le surenroulement négatif généré par la transcription persiste et s'accumule alors que le surenroulement positif est sélectivement annulé par la gyrase. D'autres suggèrent que la formation d'hypersurenroulement ne requiert pas nécessairement l'ancrage à la membrane pendant la transcription, mais que l'effet de masse du complexe transcriptionnel grandissant (ARN polymérase, transcrit, ribosomes, peptide) est suffisant pour générer des tensions dans l'ADN qui, chez le mutant *topA*, se traduisent par l'hypersurenroulement (Wu *et al.*, 1988). D'ailleurs, des études ont montré que la transcription sur un plasmide qui ne possède pas le gène *tetA* ou tout autre gène dont le produit est ancré à la membrane, peut générer de l'hypersurenroulement négatif (Wu *et al.*, 1988). La présence de plusieurs unités transcriptionnelles et leurs directions respectives sur le plasmide peuvent également accentuer ce phénomène. Il a été suggéré que l'ancrage à la membrane n'est pas nécessaire pour générer de l'hypersurenroulement lorsque la transcription est dirigée à partir d'un promoteur fort (Bowater *et al.*, 1994; Spirito *et al.*, 1994). Encore un autre mécanisme proposé pour la formation de l'hypersurenroulement négatif suggère que la polymérase seule peut induire des tensions relativement importantes dans l'ADN puisqu'il s'enveloppe autour de

cette dernière, introduisant ainsi des supertours dans la double hélice (Chen & Lilley, 1999). La force du promoteur peut également amplifier cet effet puisque la présence de nombreuses polymérases sur une même unité transcriptionnelle permet d'accumuler ces tensions (Chen & Lilley, 1999). Bien qu'ils diffèrent légèrement dans les facteurs impliqués et dans leur degré d'efficacité, ces mécanismes s'expliquent tous en fonction du « Twin- Domain Model » de Liu et Wang (Liu & Wang, 1987) où des tensions s'accumulent derrière le complexe transcriptionnel en absence de topoisomérase I et se traduisent par la formation d'ADN hypersurenroulé négativement.

Un mécanisme différent proposé pour la formation de plasmides hypersurenroulés implique les R-loops (Drolet *et al.*, 1994). Lors de la transcription en absence de *topA*, le surenroulement négatif qui persiste derrière l'ARN polymérase favoriserait la réhybridation du transcrit nouvellement synthétisé avec le brin matrice, laissant le brin non matrice non apparié et formant le R-loop. Les étapes précises de la formation des R-loops demeurent peu connues à ce jour. Les données actuelles ne permettent pas d'affirmer si le R-loop est une simple extension de l'hybride à l'intérieur de la bulle de transcription ou si la structure est formée par le ré-appariement de l'ARN avec le brin matrice en amont du complexe transcriptionnel. L'hypersurenroulement sensible à l'action de la RNase HI a en effet été observé chez les mutants $\Delta topA$ et des plasmides portant des R-loops ont été extraits de ces même cellules (Massé *et al.*, 1997). Parce qu'ils n'ont jamais été mis en évidence directement, il est difficile de déterminer le mécanisme exact de la formation d'hypersurenroulement dépendant des R-loops. Les connaissances actuelles ne permettent toujours pas de distinguer entre les possibilités qu'un R-loop long, plusieurs R-loops courts, ou un R-loop qui cause des problèmes d'élongation de la transcription et qui a pour conséquence de bloquer toutes les polymérases suivantes, serai(en)t formé(s) et impliqué(s) dans l'accumulation d'hypersurenroulement (Drolet *et al.*, 2003).

Les problèmes de croissance des mutants $\Delta topA$ avaient en grande partie été attribués à la formation de R-loops (Drolet *et al.*, 1995; Massé & Drolet, 1999a, 1999b & 1999c; Broccoli *et al.*, 2000) mais il a toujours été impossible d'affirmer que ces structures étaient complètement responsables de l'inhibition de croissance de ces mutants. En effet, plusieurs observations ont été faites dans notre laboratoire qui ne peuvent s'expliquer que par la formation de R-loops. Par exemple, la surproduction de la RNase HI à basse température ne complémente pas les problèmes de croissance des mutants $\Delta topA$ (Drolet *et al.*, 1995; Massé & Drolet, 1999c). Au contraire, elle semble même avoir un effet négatif sur la survie cellulaire dans ces conditions. La surproduction de la topoisomérase III permet de surmonter l'effet négatif de la RNase HI à basse température et permet de rétablir les bienfaits de la surproduction de la RNase HI chez ces mutants (Broccoli *et al.*, 2000; fig 1, p. 67). Ce résultat avait été expliqué par l'idée que certains ARNs (dont la transcription devient plus rare à basse température) ne devaient pas être dégradés et que la topoisomérase III, en empêchant la formation de R-loops par un mécanisme qui n'implique pas la dégradation de l'ARN, permet la synthèse protéique et la survie de ces cellules. Les ARNs dont la transcription est plus fréquente seraient moins affectés par la surproduction de la RNase HI. Quoique nous ne puissions pas, à ce stade, exclure cette possibilité, les résultats présentés dans cette étude sur les mécanismes de l'hypersurenroulement pendant la transcription chez les mutants $\Delta topA$, fournissent des informations supplémentaires qui permettent de mieux expliquer ces résultats antérieurs qui demeuraient difficiles à interpréter.

Étude des plasmides hypersurenroulés négativement par électrophorèse en présence de chloroquine

Tel que mentionné dans l'introduction, il est possible d'évaluer le surenroulement de plasmides en les analysant par électrophorèse en présence d'un agent intercalant. La chloroquine est un de ces agents intercalants qui change la mobilité relative des plasmides surenroulés en fonction des concentrations

employées. Ainsi, les plasmides surenroulés négativement sont progressivement relaxés par des concentrations croissantes de chloroquine alors que les plasmides surenroulés positivement sont progressivement surenroulés davantage dans les mêmes conditions. Lorsqu'un plasmide est extrait d'une cellule, celui-ci peut présenter des niveaux variés de surenroulement négatif. Il s'agit en réalité d'une population de plasmides avec des niveaux de surenroulement différents (ou topoisomères). Le surenroulement des plasmides *in vivo* est influencé par plusieurs facteurs dont la transcription, la réplication, la présence de R-loops et l'état des topoisomérases de la cellule (voir introduction). Lorsque des topoisomères sont analysés par électrophorèse en présence d'une concentration X de chloroquine (7,5 µg/ml dans nos conditions), les topoisomères seront relaxés en fonction de leur surenroulement. Ainsi, les topoisomères les plus surenroulés seront relaxés partiellement, certains qui sont moins surenroulés seront relaxés complètement, et ceux qui étaient au départ moins surenroulés négativement deviendront surenroulés positivement suite à l'action de la chloroquine. Le terme hypersurenroulé est réservé aux plasmides qui ne sont aucunement résolus par la chloroquine, même à des concentrations extrêmement élevées (Pruss, 1985; Wu *et al.*, 1988). La mobilité relative de cette population n'est donc pas affectée par la présence de cet agent intercalant. Il est possible de distinguer des plasmides hypersurenroulés de plasmides qui possèdent des noeuds topologiques par le fait que les plasmides hypersurenroulés sont relaxés lorsque traités avec la topoisomérase I de *E. coli in vitro* (Phoenix *et al.*, 1997).

Stimulation de l'hypersurenroulement négatif par une baisse de température et par l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse protéique

L'activité gyrase des mutants $\Delta topA$ employés dans nos études est réduite à 37°C en raison de la mutation compensatoire thermosensible dans *gyrB* décrite précédemment (Drolet *et al.*, 1995). Il avait été montré que la gyrase était complètement réactivée lorsque ces cellules étaient exposées à une température de 28°C. Par contre, la quantité de plasmides hypersurenroulés négativement extraits

à 21°C était toujours beaucoup plus importante que celle obtenue à 28°C, et ce, peu importe les souches *ΔtopA* employées (Massé & Drolet, 1999a; Massé & Drolet, 1999c). De plus, l'hypersurenroulement associé à la transcription du fragment *HindIII* de l'opéron *rrnB* sous contrôle d'un promoteur pouvant être induit par l'ajout d'IPTG devenait progressivement indépendant de la présence d'IPTG au fur et à mesure que la température baissait (Massé & Drolet, non publié). Si la gyrase est déjà pleinement active à 28°C, il est impossible d'expliquer ces observations en fonction de la simple stimulation de la formation de R-loops par la réactivation de la gyrase, un régulateur positif connu de la formation de ces structures. Une corrélation a par contre été faite entre l'accumulation d'hypersurenroulement chez les mutants *ΔtopA* et l'absence de croissance (Massé & Drolet, 1999c). La température comme tel semblait donc jouer un rôle dans l'accumulation de plasmides hypersurenroulés et dans les problèmes de croissance chez les mutants *ΔtopA*, mais le rôle des R-loops dans l'hypersurenroulement à basse température n'était pas clair.

L'inhibition de la traduction de *tetA* de pBR322 par une délétion de la séquence « Shine- Dalgarno » et de celle responsable de l'ancrage à la membrane sans toutefois empêcher sa transcription (pBR322 Δ *tet5'*) élimine l'hypersurenroulement généré par le mécanisme d'ancrage à la membrane et permet de mettre en évidence un mécanisme alternatif qui, étant donné sa sensibilité à l'action de la RNase HI, semble impliquer la formation de R-loops (Massé & Drolet, 1999b). Une délétion plus importante qui inactive le promoteur de *tetA* (pBR322 Δ *EcoRI-EcoRV*) élimine complètement toute forme d'ADN hypersurenroulé négativement. Une façon alternative d'inhiber la synthèse protéique est bien sûr de faire appel à des antibiotiques. L'hypersurenroulement de pBR322 lié à la co- transcription/traduction du gène *tetA* est d'ailleurs sensible à l'ajout de substances qui inhibent la synthèse protéique à 37°C (Massé & Drolet, 1999b). Par contre, une exposition prolongée à la spectinomycine des cellules de la souche DM800 dont l'activité de la gyrase n'est pas thermorégulée et qui pourrait donc soutenir un niveau de transcription adéquat à 37°C, permet

éventuellement l'accumulation de plasmides hypersurenroulés par un autre mécanisme (annexe, figure 5, p. 198). La sensibilité de cet hypersurenroulement à l'action de la RNase HI n'a pas été évaluée donc il n'est pas possible d'affirmer que des R-loops soient en cause à ce stade.

À notre surprise, l'ajout de spectinomycine à la culture cellulaire stimule considérablement l'hypersurenroulement du plasmide pBR322 $\Delta tet5'$ à 28°C et à 22°C (figure 5A, p. 116 et non montré), mais non l'hypersurenroulement du plasmide pBR322 $\Delta EcoRI-EcoRV$ où une plus grande délétion de la région 5' du gène *tetA* empêche sa transcription. Il n'est donc pas possible d'expliquer le résultat obtenu avec pBR322 $\Delta tet5'$ en fonction de la participation des autres gènes du plasmide à l'hypersurenroulement suite au découplage forcé entre la transcription et la traduction puisqu'une délétion plus poussée en 5' du gène *tetA* élimine complètement l'hypersurenroulement du plasmide. Il semble donc que les gènes autres que *tetA* sur le plasmide ne contribuent pas significativement à l'hypersurenroulement de pBR322. Il est alors par contre surprenant que l'hypersurenroulement de pBR322 $\Delta tet5'$ soit stimulé par la spectinomycine puisque le gène *tetA* semble être le seul contribuant à la formation de cette population de plasmides et que dans ce cas, sa traduction soit déjà inhibée par la délétion décrite ci-dessus. De plus, la surproduction de RNase HI en présence de spectinomycine n'a aucun effet sur l'accumulation d'hypersurenroulement alors qu'en absence de l'antibiotique, cette dernière réussit à l'éliminer (figure 5B, p. 116). Nous avons confirmé que les niveaux d'activité de la RNase HI ne sont pas altérés par cette exposition prolongée en présence de spectinomycine (résultats non montrés).

Toutes les observations décrites ci-dessus ne peuvent donc pas aisément être expliquées en fonction du modèle classique impliquant les R-loops. Les résultats présentés dans la seconde étude sur les mécanismes de l'hypersurenroulement négatif induit par la transcription chez les mutants $\Delta topA$

de *E. coli* adressent ces questions et permettent de proposer un modèle qui permet finalement une meilleure interprétation de toutes ces observations.

Étude des facteurs qui influencent la formation de plasmides hypersurenroulés en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique

Afin d'étudier l'importance du couplage entre la transcription et la traduction pour empêcher l'hypersurenroulement, nous avons employé diverses méthodes pour inhiber la synthèse protéique de manière spécifique ou non spécifique. L'ajout d'un antibiotique qui inhibe la traduction devrait, en principe, libérer les transcrits des ribosomes, et par conséquent, devrait promouvoir la formation généralisée de R-loops lors de la transcription de gènes qui sont normalement traduits. Tel que mentionné ci-dessus, la présence d'un inhibiteur de la traduction stimule l'accumulation d'ADN hypersurenroulé négativement. À notre surprise, même la transcription de gènes non traduits au départ (*tetAΔ5'* et le fragment *HindIII* de *rrnB*) permet l'accumulation de quantités extraordinaires de plasmides hypersurenroulés négativement en présence d'antibiotiques qui inhibent la traduction, et ces derniers sont résistants à l'action de la RNase HI (alors qu'ils y sont sensibles lorsque la synthèse protéique procède normalement). Afin de mieux comprendre les effets des inhibiteurs de la synthèse protéique sur l'accumulation d'ADN hypersurenroulé, nous avons analysé la topologie de l'ADN et la synthèse de l'ARN en parallèle afin de tenter de saisir comment ces substances affectent la transcription.

Le ppGpp ne joue pas un rôle dans l'hypersurenroulement en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique

Dans un premier temps, il est connu que l'inhibition de la synthèse protéique stimule le taux de synthèse des ARNr (Schneider *et al.*, 2002). Il est possible que cette augmentation de l'expression des gènes *rrn* soit liée à une baisse des niveaux intracellulaires de (p)ppGpp (Muto *et al.*, 1975; Cortay &

Cozzzone, 1983). La guanosine tétraphosphate (ppGpp) est un nucléotide effecteur (ou alarmone) dont les niveaux intracellulaires augmentent lors de conditions de croissance difficiles (pénurie de nutriments) afin de réguler les activités métaboliques des cellules (voir Chatterji & Ojha, 2001 pour une revue sur le sujet). Lorsque les niveaux intracellulaires de (p)ppGpp augmentent, la demi-vie des complexes ouverts diminue, ce qui se traduit par une baisse radicale de la synthèse des ARNr (Barker *et al.*, 2001). Les (p)ppGpp synthétases I et II sont encodées respectivement par les gènes *relA* et *spoT* (Cashel & Gallant, 1969; Hernandez & Bremer, 1991; Xiao *et al.*, 1991). Le gène *spoT* code également pour une hydrolase du (p)ppGpp. Lors d'une carence en acides aminés, le (p)ppGpp est synthétisé principalement par *relA* alors que le niveau basal de (p)ppGpp en phase exponentielle provient de *spoT* (Cashel, 1969; Lazzarini *et al.*, 1971; Harshman & Yamazaki, 1971; Lagosky & Chang, 1980; Ryals *et al.*, 1982). La sensibilité des niveaux de (p)ppGpp à l'inhibition de la synthèse protéique lors de la croissance cellulaire peut s'expliquer par la courte demi-vie de la synthétase II encodée par *spoT* (Murray & Bremner, 1996). Même s'il joue un rôle direct dans la transcription via son interaction avec l'ARN polymérase (Wagner, 2002; Jores & Wagner, 2003), nos résultats nous ont permis d'exclure le (p)ppGpp comme étant un facteur impliqué directement dans l'hypersurenroulement généré en absence de traduction (figure 3A, p. 112) puisque l'ajout d'antibiotiques qui inhibent la traduction stimule l'hypersurenroulement même dans une souche (p)ppGpp⁰.

La stabilisation des ARNs dû à une pénurie de ribonucléases contribue l'accumulation de plasmides hypersurenroulés en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique

Une autre conséquence de l'inhibition de la synthèse protéique est une augmentation des réserves de NTPs et il a été proposé que l'initiation de la transcription des ARNr était également sensible à de telles variations (Schneider *et al.* 2002). Parce que les cellules dépourvues d'activité topoisomérase I

éprouvent d'importantes difficultés à synthétiser l'ARNr en raison de problèmes d'élongation de la transcription qui semblent impliquer la formation de R-loops, une augmentation du taux de synthèse des ARNr exigerait une quantité importante d'activité RNase HI dans cette région afin d'assurer une croissance adéquate de ces cellules (Hraiky *et al.*, 2000; Drolet *et al.*, 1995). Lors de la synthèse des ARNr, des étapes bien précises impliquant une série de ribonucléases spécifiques (RNase E, RNase III, RNase P, PNPase, etc.), sont nécessaires à la maturation des ces ARNs (ARNr et ARNt) afin de servir à l'assemblage de ribosomes fonctionnels et/ou à la synthèse protéique (Srivastava & Schlessinger, 1990). Certaines de ces mêmes RNases sont également impliquées dans la dégradation des transcrits qui ont servi à la synthèse protéique (Kushner, 2002). En temps normal, il est peu probable qu'une molécule d'ARN nue échappe à l'action de ces RNases. Une séquestration de ces dernières vers les opérons ribosomiaux peut par contre générer une pénurie de ribonucléases dans la cellule et par conséquent, peut contribuer à l'augmentation de la stabilité relative des ARNm (Lopez *et al.*, 1998). Ce phénomène est mis en évidence dans la figure 6 (p. 117) où l'ARN *tetA* semble être considérablement stabilisé par la présence de spectinomycine. Cette même situation a été observée chez de nombreux transcrits dans le laboratoire et ne semble pas spécifique à l'ARN de *tetA* (Baaklini *et al.*, soumis pour publication). De même, plusieurs types d'antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique ont été testés et malgré des niveaux d'efficacité variables, ces derniers semblent tous générer les mêmes problèmes chez les mutants $\Delta topA$ employés (stabilisation des ARNs, stimulation de l'hypersurenroulement des plasmides et résistance de cet hypersurenroulement à l'action de la RNase HI).

Nous avons exclu la possibilité que l'hypersurenroulement était spécifique aux plasmides de type ColE1 dont la réplication dépend de la formation d'un R-loop (figure 4, p. 114). En effet, des plasmides ayant des origines de réplication variées deviennent hypersurenroulés négativement en présence d'un inhibiteur de la traduction chez des mutants $\Delta topA$. Nous avons également exclu la possibilité

qu'une augmentation du taux de réplication sur les plasmides en raison d'une inhibition de la réplication à *oriC* (dont la sensibilité aux inhibiteurs de la traduction est connue), soit responsable de l'hypersurenroulement des plasmides de type ColE1 puisque le plasmide pBR322 Δ *tetEcoRI-EcoRV* ne devient jamais hypersurenroulé en présence de spectinomycine (résultat non montré) et il n'y a aucune raison de croire que sa réplication soit altérée par la délétion décrite antérieurement (Massé & Drolet, 1999b). Il est par contre possible que la sensibilité de l'hypersurenroulement des divers plasmides testés à l'action de la RNase HI varie en fonction des niveaux produits en *trans*. Ainsi, les plasmides pSK760 et pEM001 qui surproduisent l'activité RNase HI de 10 à 15 fois par rapport au niveau physiologique améliorent considérablement la croissance des mutants *topA* et éliminent l'hypersurenroulement des plasmides lorsque la synthèse protéique n'est pas inhibée par un antibiotique (Drolet *et al.*, 1995). Par contre, les niveaux de RNase HI produits par ceux-ci semblent inefficaces lorsque la traduction est inhibée. Il est donc possible que les niveaux de RNase HI requis en absence de traduction afin d'éliminer l'ADN hypersurenroulé négativement généré par l'un ou par l'autre des mécanismes proposés (voir ci-dessous) soient plus importants que ceux requis lorsque la synthèse protéique procède normalement.

Les propriétés de l'ARN polymérase et la longueur du transcrit contribuent à l'accumulation de plasmides hypersurenroulés en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique

Il est intéressant de noter qu'une mutation dans *rpoB* qui altère les propriétés d'élongation de l'ARN polymérase de *E. coli* permet d'éliminer le problème d'hypersurenroulement lorsque la traduction est inhibée (fig. 3A, p. 112; fig. 4, p. 114; fig. 5A, p. 116). Les quantités d'hypersurenroulement de pBR322 liées à l'ancrage à la membrane du peptide TetA sont semblables dans toutes les souches testées (fig. 3A, p. 112). Une étude de l'ARN de *tetA* issu de cette souche nous a permis de constater que cette dernière accumule des ARNs

plus courts (fig 3B, p. 113). Ceci soutient que les niveaux de transcription (initiation) sont comparables dans les trois souches et confirme que seulement la partie 5' du gène *tetA* est nécessaire à l'accumulation de cette population de plasmides par le mécanisme de l'ancrage à la membrane. La terminaison prématurée de la transcription semble donc être un moyen efficace de prévenir l'accumulation d'ADN hypersurenroulé lorsque la synthèse protéique est inhibée chez les mutants *topA*. Contrairement à ce qui avait été proposé par Chen & Lilley en 1999, il semble que l'ARN polymérase seule soit incapable de générer des tensions suffisamment importantes pour qu'elles se traduisent en hypersurenroulement, et qu'un transcrit d'une certaine longueur est requis afin que l'ADN devienne hypersurenroulé. Il est intéressant de souligner que la surproduction de la RNase HI dans cette souche semble nuire à la croissance de cette dernière, même à 28°C, soit une température où la RNase HI améliore généralement la croissance des autres mutants *topA* (résultats non montrés et Drolet *et al.* 1995). Contrairement à ce qui avait été rapporté pour les mutants *topA*, cette absence de croissance n'est pas liée à l'accumulation d'ADN hypersurenroulé puisque cette souche ne semble pas en produire autant que les autres souches testées (voir fig. 3A, p. 112; fig. 4, p. 114; fig. 5A, p. 116). La plus simple explication serait que l'effet négatif de la RNase HI sur la croissance de cette souche soit lié à la dégradation des transcrits qui sont plus rares en raison d'une part, de la basse température, et d'autre part, de la proportion relativement importante de chaînes incomplètes dues à la terminaison prématurée de la transcription. Incapable de soutenir un niveau de synthèse protéique adéquat dans ces conditions, cette souche ne peut survivre.

Les résultats présentés ici démontrent une corrélation entre la longueur de l'ARN et la quantité d'ADN hypersurenroulé obtenue en absence de synthèse protéique. Ils suggèrent donc que la longueur de l'ARN naissant peut engendrer des tensions assez importantes pour permettre l'accumulation d'ADN hypersurenroulé négativement pendant la transcription *in vivo* en absence de traduction chez les mutants *topA*. La longueur croissante du transcrit favorise

alors l'hypersurenroulement dans le contexte du « Twin- Domain Model » par son effet de masse. L'importance de la longueur des ARNs dans l'accumulation de surenroulement induit par la transcription avait d'ailleurs été constatée dans des études *in vitro* précédentes (Tsao *et al.*, 1989; Leng & McMacken, 2002). Rappelons que dans les essais *in vitro*, les ribosomes et les ribonucléases sont absents (à moins d'être inclus(es) dans les essais en question) et peuvent, en quelque sorte, mimer une situation où la synthèse protéique est inhibée *in vivo*. En effet, des transcriptions *in vitro* effectuées dans notre laboratoire avec l'ARN polymérase de *E. coli* ont révélé que l'hypersurenroulement était sensible à la RNase A, une endoribonucléase spécifique à l'ARN simple brin (Massé *et al.*, 1997). Ce résultat avait été attribué à la structure même de l'hybride qui pouvait présenter des régions d'ARN simple brin. Suite aux résultats présentés dans cette étude, nous pouvons également interpréter ces résultats en fonction du modèle impliquant la longueur des ARNs. *In vitro*, l'ARN naissant peut être allongé dû à l'absence des ribonucléases et peut contribuer à l'hypersurenroulement du plasmide. L'ajout de RNase A peut empêcher l'hypersurenroulement en réduisant la taille du transcrit. Au contraire, l'hypersurenroulement formé lors de la transcription avec l'ARN polymérase du phage T7 pourrait toujours impliquer la formation de R-loops, une conséquence de l'extension de l'hybride à l'intérieur de la bulle de transcription (Gopal *et al.*, 1999). Ainsi, l'hypersurenroulement généré par la transcription avec cette dernière est résistant à l'action de la RNase A *in vitro*. Cette distinction au niveau de la sensibilité de l'hypersurenroulement généré par ces deux ARN polymérases à la RNase A peut s'expliquer par des différences structurelles entre les deux, puisqu'il a été suggéré que l'ARN polymérase de *E. coli* possède une fonction séparatrice qui déplace l'ARN afin que celui-ci ne demeure pas hybridé avec la matrice. Cette fonction serait absente de l'ARN polymérase du phage T7 et des R-loops pourraient donc résulter de l'extension de la bulle de transcription chez cette dernière.

L'une des hypothèses initialement envisagée pour expliquer l'effet des inhibiteurs de la synthèse protéique sur l'hypersurenroulement chez les mutants

ΔtopA concernait donc cette pénurie de ribonucléases et la stabilisation des transcrits qui leur permettait d'atteindre d'importantes longueurs. L'absence d'effet RNase HI sur cet hypersurenroulement s'expliquait par le fait que dans ce cas, la formation de cette population d'ADN impliquait un mécanisme qui dépendait majoritairement de la longueur de l'ARN plutôt que de la formation de R-loops. Nous avons récemment observé que la surproduction de la RNase E, une endoribonucléase impliquée à la fois dans la maturation des ARNr et dans la dégradation des ARNm (Kushner, 2002), n'a aucun effet sur l'hypersurenroulement du plasmide pBR322 $\Delta tet5'$ en présence de spectinomycine (résultat non montré). Quoiqu'il soit possible que les niveaux surproduits ne soient pas extraordinaires, ou que des sites pour l'action de cette dernière ne soient pas présents dans le gène *tetA*, nous croyons qu'il est peu probable que la pénurie de ribonucléases soit entièrement responsable des phénomènes observés ici. D'ailleurs, si la longueur de l'ARN libre est une conditions suffisante pour générer de l'hypersurenroulement (résistant à la RNase HI), alors tous les gènes traduits (dont l'effet de masse serait encore plus important) devraient générer de l'hypersurenroulement résistant à la RNase HI chez les mutants *topA*, ce qui n'est clairement pas le cas.

Le ratio ATP/ADP et l'activité de la gyrase contribuent à la stabilisation de l'hypersurenroulement en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique

Tel que mentionné ci-dessus, une inhibition de la synthèse protéique par l'ajout d'antibiotiques est accompagnée d'une augmentation drastique des concentrations intracellulaires de NTP (Schneider *et al.*, 2002). Le ratio ATP/ADP étant un moyen efficace de réguler les niveaux d'activités de la gyrase, une inhibition de la traduction peut, par conséquent, influencer le niveau de surenroulement de l'ADN (Drlica, 1992; Kampranis & Maxwell, 1996; van Workum *et al.*, 1996; Westerhoff *et al.*, 1988). Rappelons que la gyrase possède la capacité d'introduire des supertours négatifs en présence d'ATP et qu'elle peut également relaxer des supertours (positifs ou négatifs) en absence d'ATP *in vitro*.

Une augmentation des concentrations intracellulaires d'ATP peut alors stimuler l'activité de surenroulement de la gyrase au dépend de celle de relaxation alors qu'une baisse du ratio ATP/ADP permet la situation inverse (Drlica, 1992). D'ailleurs, nous avons trouvé que une corrélation directe entre les concentrations de spectinomycine employées et les niveaux d'hypersurenroulement négatif générés chez les mutants $\Delta topA$ (résultats non montrés). La proportion d'hypersurenroulement observée atteint un plateau à une concentration de l'antibiotique qui correspond à celle qui cause une inhibition de la croissance. Cette même corrélation a été observée pour plusieurs antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique (résultats non montrés).

Une stimulation de l'activité de surenroulement de la gyrase lors de l'inhibition de la synthèse protéique peut vraisemblablement favoriser l'accumulation de plasmides hypersurenroulés par deux mécanismes principaux, soit la formation de R-loops et l'accumulation de tensions en raison de la longueur croissante du transcrit naissant dans le contexte du « Twin- Domain Model ». Selon le modèle classique impliquant un R-loop, la formation/élongation de cette structure dont la gyrase est un régulateur positif connu, peut générer de l'hypersurenroulement (Drolet *et al.*, 1995, Phoenix *et al.*, 1997, Massé *et al.*, 1997). Ainsi, la gyrase peut stimuler l'hypersurenroulement par le second mécanisme en permettant à la transcription de progresser et de générer des ARNs plus longs. Une possibilité fort intéressante à considérer est le fait que l'ADN hypersurenroulé négativement généré de cette façon peut, à l'inverse, stimuler la formation subséquente de R-loops qui peuvent contraindre ce surenroulement. La RNase HI pourrait alors agir à deux niveaux. Selon le premier mécanisme, elle pourrait tout d'abord dégrader le R-loop tel que proposé dans des études antérieures (Drolet *et al.*, 1995, Phoenix *et al.*, 1997, Massé *et al.*, 1997) de sorte à empêcher l'accumulation d'ADN hypersurenroulé. Si l'ADN hypersurenroulé négativement est généré avant le R-loop, la RNase HI rendrait l'ADN hypersurenroulé accessible à l'activité de relaxation de la gyrase en dégradant l'hybride qui le contraint. Si par contre, cette activité de la gyrase est

affaiblie (en raison d'une augmentation de la concentration intracellulaire d'ATP, par exemple), l'hypersurenroulement serait alors stabilisé et la dégradation de l'ARN à l'intérieur de l'hybride par la RNase HI n'aurait aucun effet.

*Effets de la surproduction de la RNase HI sur l'accumulation de plasmides hypersurenroulés chez les mutants $\Delta topA$ de *E. coli**

Les effets plus ou moins visibles de la surexpression de la RNase HI *in vivo* sur l'accumulation d'ADN hypersurenroulé négativement dépendent donc grandement du mécanisme par lequel cette population de plasmides est formée chez ces cellules. Rappelons qu'il y a une forte corrélation entre la présence d'ADN hypersurenroulé négativement et l'inhibition de croissance chez les mutants *topA* de *E. coli* (Massé & Drolet, 1999c). La surproduction de la RNase HI réduit l'accumulation de plasmides hypersurenroulés lorsque la synthèse protéique n'est pas inhibée par des antibiotiques, tel que rapporté antérieurement par des études effectuées dans notre laboratoire (Phoenix *et al.*, 1997; Massé *et al.*, 1997; Massé & Drolet, 1999a, 1999b). Il est par contre difficile de conclure sur le mécanisme par lequel la RNase HI inhibe l'ADN hypersurenroulé négativement dans ces conditions.

Les évidences actuelles pour la formation de R-loops *in vivo* et *in vitro* sont indirectes et sont basées sur la sensibilité de plasmides hypersurenroulés négativement, et de plasmides portant des R-loops dont la migration est retardée sur gel d'agarose, à l'action de la RNase HI (Phoenix *et al.*, 1997; Massé *et al.*, 1997; Massé & Drolet, 1999a, 1999b, 1999c). Les résultats de retardement sur gel d'agarose suggéraient que des courts R-loops étaient formés sur les plasmides, possiblement le résultat de l'extension de l'hybride ADN-ARN à l'intérieur de la bulle de transcription. D'ailleurs, des études précédentes avec l'ARN polymérase du phage T7 qui partage un grand nombre de propriétés avec l'ARN polymérase de *E. coli*, soutiennent l'hypothèse que la taille de cet hybride peut varier en fonction du niveau de surenroulement de l'ADN (Gopal *et al.*, 1999). Selon ce

modèle, l'hybride à l'intérieur de la bulle de transcription deviendrait, dans certaines circonstances, sensible à l'action de la RNase HI. La sensibilité des plasmides hypersurenroulés négativement à l'action de la RNase HI suggérait au contraire, que de très longs R-loops, s'étendant sur plusieurs centaines de paires de bases, étaient synthétisés. Le fait que l'inhibition de la traduction du gène *tetA* par une délétion de la région 5' du gène (pBR322 Δ *tet5'*; Massé & Drolet, 1999b) permet de générer de l'hypersurenroulement sensible à la RNase HI favorise cette dernière hypothèse. Suite aux résultats présentés ici, il est maintenant de plus en plus clair que l'hypersurenroulement peut également exister sous forme libre *in vivo*. La gyrase est l'enzyme majoritairement responsable de sa relaxation (voir ci-dessous) sauf si ce dernier est contraint par la présence d'un R-loop. Dans ce cas, l'hybride doit être dégradé (par la RNase HI) avant que la gyrase ne puisse le relaxer.

Effets de la température sur l'accumulation de plasmides hypersurenroulés chez les mutants Δ topA de E. coli

L'effet négatif de la RNase HI sur l'accumulation de plasmides pBR322 Δ *tet5'* (où le gène *tetA* est transcrit mais non traduit) hypersurenroulés négativement à 28°C chez les mutants *topA* lorsque la synthèse protéique n'est pas inhibée par des antibiotiques (Massé & Drolet, 1999c) peut donc s'expliquer de plusieurs façons. Il se peut que la réactivation de la gyrase suite à la baisse de température favorise la formation de R-loops et que la RNase HI, en éliminant ces structures, prévienne la formation d'ADN hypersurenroulé (peu importe si le mécanisme implique de longs R-loops ou un empilement de polymérases dû à des R-loops courts). Il se peut aussi que l'effet négatif de la surproduction de la RNase HI sur l'ADN hypersurenroulé négativement soit un effet indirect, et qu'il implique la dégradation de l'ARN naissant par les RNases libres. Rappelons qu'une inhibition « naturelle » de la synthèse protéique a été observée chez les mutants Δ *topA* suite au changement soudain de température de 37°C à 28°C (Baaklini *et al.*, soumis pour publication) et que cette dernière est transitoire

(contrairement à celle qui est induite par l'ajout d'un antibiotique). Le recrutement des nucléases vers les opérons ribosomiaux dans ces conditions ne peut être que temporaire puisque la surexpression de la RNase HI corrige les problèmes d'élongation de la transcription chez le mutant *topA* (Hraiky *et al.*, 2000; Baaklini *et al.*, soumis pour publication). Une fois l'équilibre rétabli, il est peu probable que l'ARN *tetA* non traduit de pBR322 Δ *tet5'* puisse échapper à la dégradation par ces dernières. La réduction de la taille du transcrit contribue à empêcher l'hypersurenroulement en diminuant son effet de masse sur le complexe transcriptionnel. Une dernière possibilité est que la taille de l'ARN *tetA* favorise l'hypersurenroulement du plasmide et que les R-loops surviennent après l'hypersurenroulement. La RNase HI, en dégradant la partie ARN du R-loop qui contraint ce surenroulement, permet ainsi sa relaxation subséquente par la gyrase. Les résultats présentés ici ne permettent pas de conclure si tous ces mécanismes ont lieu indifféremment dans la cellule ou si, selon les circonstances, l'un domine sur l'(les) autre(s).

Stabilisation de l'hypersurenroulement par une baisse de température et le rôle des topoisomérases dans la relaxation de l'hypersurenroulement

Tel que mentionné ci-dessus, des travaux récents de notre laboratoire ont montré qu'une baisse de température de 37°C à 28°C était accompagnée d'une inhibition transitoire de la synthèse protéique chez toutes les cellules testées mais que cette inhibition était plus prononcée chez le mutant *topA gyrB* (Ts) employé (Baaklini *et al.*, soumis pour publication). Cette étude montre également que la surexpression de la RNase HI chez ce mutant permet de réduire la période d'arrêt de croissance en permettant la synthèse d'ARNs de pleine longueur, rétablissant ainsi une synthèse protéique normale. Une baisse plus prononcée de la température (22°C) peut vraisemblablement accentuer tous ces phénomènes. D'ailleurs, c'est à basse température que la surproduction de la RNase HI nuit à la croissance des mutants *topA* testés.

Il est intéressant de souligner que nos résultats indiquent que la baisse de température en soi, peut stimuler l'hypersurenroulement chez les mutants *topA* (résultats non montrés). La quantité d'ADN hypersurenroulé observée à basse température est tellement importante, que le mécanisme de formation de cette population de plasmides dans ces conditions semblait, à première vue, encore plus efficace que celui lié à l'ancrage à la membrane du peptide TetA naissant. Il faut rappeler que la proportion d'ADN hypersurenroulé extraite chez les divers mutants $\Delta topA$ reflète le résultat de la quantité d'hypersurenroulement synthétisée, moins celle qui est relaxée. Puisque les activités enzymatiques sont, de façon générale, réduites au fur et à mesure que la température baisse, il serait alors possible que l'hypersurenroulement à basse température soit le résultat non pas d'une synthèse plus importante de cette population de plasmides, mais plutôt d'une stabilisation de cette dernière en raison d'une plus faible relaxation de l'hypersurenroulement (voir figure 7, p. 118).

Rôle de la gyrase dans la relaxation de l'hypersurenroulement à basse température

Il est intéressant de souligner que l'activité de la gyrase peut varier également en fonction de la température (Kataoka *et al.*, 1996). L'étude de Kataoka *et al.* en 1996 a montré que l'activité de relaxation de la gyrase était réduite au fur et à mesure que la température baissait alors que son activité de surenroulement augmentait. Il serait alors logique de croire que, la gyrase étant l'activité de relaxation principale de l'hypersurenroulement, si son efficacité de relaxation est réduite au fur et à mesure que la température d'incubation est baissée, la stabilité de l'ADN hypersurenroulé serait alors augmentée. Rappelons que la sous-unité GyrA de la souche DM800 a été isolée comme suppresseur multicopie de mutations *topA* à toutes les températures testées (Broccoli *et al.*, 2000; tableau II, p. 65). Des études plus poussées ont montré que la surexpression de cette dernière *in vivo* permet de réduire l'hypersurenroulement négatif à 22°C, et par conséquent, d'améliorer considérablement la croissance des mutants *topA*

dans ces conditions (J. Douville & M. Drolet, non publié). Par contre, la surexpression de cette dernière ne corrige aucunement les problèmes d'élongation de la transcription au niveau des opérons ribosomiaux, ni le problème de synthèse d'activité β -galactosidase éprouvés par les mutants $\Delta topA$ (J. Douville & M. Drolet, non publié). La sous-unité GyrA de la souche DM800 ($\Delta topA$) semble donc améliorer les problèmes de croissance des mutants $\Delta topA$ en relaxant l'hypersurenroulement généré par les divers mécanismes proposés (après sa formation) et possiblement également en contribuant à relaxer le niveau de surenroulement global afin de réduire les problèmes liés à l'élongation de la transcription chez les mutants $\Delta topA$.

Rôle de la topoisomérase III dans la relaxation de l'hypersurenroulement à basse température

Il est intéressant de noter que la topoisomérase III possède une plus grande spécificité de substrat que la topoisomérase I (DiGate & Marians, 1988) et que l'hypersurenroulement serait alors, en théorie, un substrat idéal pour cette dernière en raison d'une grande exposition de régions d'ADN simple brin. Sachant que la synthèse protéique est inhibée chez les mutants $topA$ à basse température et que la gyrase contribue à l'accumulation de l'hypersurenroulement plutôt qu'à sa relaxation, il est alors possible de comprendre pourquoi la surproduction de la RNase HI dans ces conditions est létale pour les mutants $topA$. Ainsi, en dégradant les ARNs (dont la transcription est plus rare à basse température), la RNase HI compromet gravement la synthèse protéique et par conséquent, la survie cellulaire. La topoisomérase III, de par sa capacité à relaxer l'hypersurenroulement et/ou le surenroulement induit par la transcription, annule l'effet négatif de la surproduction de la RNase HI et permet de rétablir son effet positif sur la croissance des cellules (stimulation de la transcription, particulièrement aux *rrns* et dégradation de R-loops).

Rôle de la topoisomérase IV dans la relaxation de l'hypersurenroulement à basse température

Il a été démontré dans ce travail qu'une surexpression des sous-unités ParC et ParE de la topoisomérase IV permet une relaxation importante du surenroulement global de l'ADN et empêche ainsi l'accumulation d'hypersurenroulement. Toutes les topoisomérases de *E. coli* semblent donc être d'une manière ou d'une autre, des régulateurs négatifs de la formation de plasmides hypersurenroulés. Par contre, aucune d'entre elles ne peut compenser pour la perte de *topA* et corriger tous les problèmes de ces cellules (synthèse de l'ARNr, synthèse protéique lors des changements soudains de température, R-loops et hypersurenroulement).

La sous-unité GyrA de la gyrase, la topoisomérase III et les sous-unités ParC et ParE de la topoisomérase IV doivent toutes être surproduite afin de corriger certaines de ces difficultés, mais demeurent inefficaces face à d'autres problèmes. La topoisomérase I semble donc être unique quant au rôle qu'elle joue dans l'élongation de la transcription qui peut générer des niveaux extraordinaires de surenroulement. D'ailleurs, une interaction fonctionnelle a été démontrée entre la topoisomérase I et l'ARN polymérase chez *E. coli* (Cheng *et al.*, 2003a). Cette interaction peut potentiellement être essentielle dans la prévention des R-loops et de l'hypersurenroulement, particulièrement lorsque les cellules sont exposées à des conditions de stress variées où une synthèse protéique rapide est de mise afin d'assurer la survie des cellules. Les résultats présentés ici montrent qu'il existe des liens forts entre la synthèse d'ARNs longs, l'accumulation d'ADN hypersurenroulé et l'activité de relaxation de la gyrase. Ainsi, la stabilisation (non relaxation) de l'ADN hypersurenroulé est une cause majeure de l'inhibition de croissance des mutants *topA* à basse température.

4. Conclusions et perspectives

Les travaux présentés ici ont permis de clarifier les divers mécanismes de surenroulement induit par la transcription chez les mutants $\Delta topA$ de *Escherichia coli*, et ont également permis d'identifier certains régulateurs de la formation de l'hypersurenroulement chez ces cellules. Ces résultats contribuent à l'avancement des connaissances dans le domaine de la transcription en absence d'activité topoisomérase I à deux niveaux. Premièrement, ils permettent de préciser les éléments minimaux requis pour induire de l'hypersurenroulement lors de la transcription dans le contexte du « Twin- Domain Model » élaboré par Liu et Wang en 1987. Plusieurs mécanismes ont été proposés au cours des années mais des controverses demeuraient toujours par rapport aux facteurs qui peuvent générer de telles tensions en absence de topoisomérase I. Ces résultats suggèrent que l'ancrage à la membrane du peptide naissant lors de la co- transcription/ traduction de gènes dont les produits sont ancrés à la membrane demeure le moyen le plus efficace pour générer de l'hypersurenroulement chez les mutants *topA*. Cette étude révèle par contre que l'ARN est nécessaire et suffisant pour induire de l'hypersurenroulement s'il parvient à atteindre une longueur critique avant d'être dégradé par des ribonucléases. Ce mécanisme avait initialement été écarté en raison du fait que les ARNs libres sont généralement rapidement dégradés *in vivo* et ne peuvent donc pas atteindre des tailles importantes. Cette condition est par contre remplie lors de l'inhibition de la synthèse protéique due à une séquestration des RNases normalement impliquées dans leur dégradation vers les opérons ribosomiaux. La seconde conclusion majeure de cette étude est que l'ADN hyper-surenroulé existe sous forme libre dans les cellules $\Delta topA$ et que la gyrase est la principale activité de relaxation de celui-ci. Il est d'ailleurs possible qu'une grande cause de la formation de R-loops chez ces cellules soit l'accumulation de cette population d'hypersurenroulement. Ainsi, l'effet RNase HI observé sur l'ADN hypersurenroulé dépend grandement du mécanisme de formation de cette population d'ADN. Selon le modèle classique, lorsqu'un R-loop est formé et qu'il est allongé grâce à l'action de la gyrase, ce dernier peut entraîner l'hypersurenroulement de la matrice qui n'est révélé qu'au moment de l'extraction de l'ADN lorsque l'hybride est dégradé. La surexpression de la

RNase HI *in vivo* prévient l'hypersurenroulement de ce type en dégradant l'ARN dans l'hybride avant qu'il n'atteigne des dimensions importantes. En conditions où la synthèse protéique est inhibée, l'hypersurenroulement peut être le résultat de la synthèse de longs ARNs libres qui sont stabilisés en raison d'une pénurie de RNases et les R-loops peuvent être formés suite à l'hypersurenroulement. Parce que l'inhibition de la traduction cause une augmentation du ratio ATP/ADP, l'activité de surenroulement de la gyrase est favorisée aux dépens de celle de relaxation dans ces conditions. Dans ce contexte, la RNase HI peut toujours dégrader l'ARN dans le R-loop mais puisque l'hypersurenroulement n'est pas relaxé de manière efficace par la gyrase, celui-ci demeure stable dans la cellule.

Il est important de souligner que l'hypersurenroulement par le mécanisme impliquant la longueur de l'ARN n'est pas restreint à des situations où la synthèse protéique est inhibée par des antibiotiques. La synthèse des ARNr fournit les conditions parfaites pour la formation d'ADN hypersurenroulé par ce mécanisme puisqu'ils sont non traduits, ils sont fortement transcrits, et ils possèdent un système d'antiterminaison efficace qui accélère la transcription. Lorsque la synthèse protéique n'est pas inhibée par l'ajout d'un antibiotique et que l'hypersurenroulement résulte de la transcription d'un gène non traduit (par le mécanisme de l'ARN long), la surproduction de la RNase HI aurait un effet négatif sur l'accumulation de ces plasmides puisque la dégradation du R-loops rendrait l'hypersurenroulement accessible à la gyrase qui le relaxerait par la suite. Une baisse importante de la température d'incubation cause une inhibition de la synthèse protéique et une accumulation d'ADN hypersurenroulé chez les mutants *topA*. L'accumulation d'ADN hypersurenroulé dans ces conditions serait alors le résultat de la non-relaxation de ce dernier par la gyrase, ce qui contribue grandement à sa stabilisation. Ainsi l'effet négatif de la RNase HI à basse température serait lié à la dégradation des ARNs qui ne sont plus disponibles pour la traduction (Massé & Drolet, 1999c; Broccoli *et al.*, 2000).

L'une des observations les plus intéressantes de ce travail est le fait que toutes les topoisomérases de *E. coli* semblent posséder la capacité d'empêcher ou d'éliminer l'ADN hypersurenroulé négativement. La topoisomérase I, bien entendu, joue un rôle inestimable durant l'élongation de la transcription et empêche la formation d'hypersurenroulement par tous les mécanismes proposés en relaxant les supertours négatifs générés par ce processus, ou en relaxant le R-loop une fois formé tel que suggéré antérieurement. La gyrase est à la fois un régulateur positif et négatif de l'hypersurenroulement. Elle peut promouvoir la formation de R-loops et l'élongation des ARNs lors de la transcription via son activité de surenroulement. Alternativement, elle possède également la capacité de relaxer l'ADN hypersurenroulé s'il n'est pas contraint par un R-loop, se comportant ainsi comme une topoisomérase II typique. La sous-unité GyrA de la souche DM800 est d'ailleurs l'un des supresseurs multicopie les plus efficace de l'hypersurenroulement, notamment à basse température où la relaxation de cet ADN est essentielle. Il est intéressant de souligner que la gyrase est l'une des nombreuses protéines « Cold- Shock » de la cellule; c'est-à-dire que son expression augmente à basse température afin de permettre l'adaptation des cellules à ces conditions et ainsi assurer leur survie. La topoisomérase III est un régulateur négatif de l'hypersurenroulement mais seulement si elle est surproduite. Elle peut relaxer le surenroulement négatif local généré par la transcription et elle peut relaxer un R-loop une fois formé. L'hypersurenroulement négatif est également un substrat idéal pour cette dernière. La topoisomérase IV peut empêcher l'accumulation d'ADN d'hypersurenroulé en réduisant le niveau de surenroulement global de l'ADN mais, encore une fois, seulement si elle est surproduite. Cette baisse du surenroulement global réduit l'incidence des R-loops possiblement en réduisant l'amplitude du surenroulement local généré par la transcription. Bien que les régulateurs négatifs de la formation d'hypersurenroulement soient nombreux, il semble pour l'instant que la topoisomérase I soit unique dans ce groupe puisqu'il est impossible de corriger tous les problèmes associés à la perte de *topA* en surproduisant ces supresseurs seuls, ou en combinaison (jusqu'à présent). Il est possible que l'interaction de

cette dernière avec l'ARN polymérase soit essentielle pour l'adaptation aux stress qui requiert une synthèse protéique rapide.

Afin d'approfondir nos connaissances sur les rôles de la topoisomérase I dans la cellule et sur les mécanismes des divers supresseurs de mutations *topA*, il serait intéressant de mieux caractériser la topoisomérase III mutée décrite antérieurement qui n'interagit plus avec la membrane et qui permet donc de meilleurs niveaux d'expression. En effet, l'une des contraintes majeures lors de l'étude sur la topoisomérase III en tant que supresseur multicopie de mutations *topA* était sa toxicité. Il serait intéressant de voir si cette topoisomérase modifiée peut entièrement compenser pour la perte de *topA* (correction des problèmes de synthèse des ARNr, de la synthèse de la β -galactosidase lors d'une baisse de température, de l'accumulation d'hypersurenroulement, de l'adaptation aux stress, etc.). En effet, parmi les supresseurs nommés ci-dessus, la topoisomérase III est la seule à agir au niveau du surenroulement local, ce qui constitue la fonction principale de la topoisomérase I. Nous pourrions ainsi vérifier s'il est possible d'inactiver le gène *topA* dans des cellules qui ne possèdent pas de mutations *gyr* compensatoires si cette version de la topoisomérase III (non toxique) est surproduite. Dans le même ordre d'idées, il serait également important de mieux caractériser la sous-unité GyrA de DM800 puisqu'elle semble être un supresseur multicopie très efficace à basse température. D'ailleurs, il serait intéressant de voir les effets de la surproduction de GyrA et de la topoisomérase III modifiée en combinaison sur la croissance des mutants *topA* et d'évaluer leur comportement face à diverses conditions de stress.

Nous avons obtenu plusieurs évidences *in vivo* qui soutiennent nos conclusions sur les mécanismes de surenroulement induit par la transcription. La prochaine étape serait donc de vérifier ces hypothèses *in vitro*. Ainsi, puisque le niveau de surenroulement semble pouvoir induire la formation subséquente de R-loop (si hypersurenroulé) ou empêcher l'accumulation d'hyperurenroulement (si le surenroulement global est relaxé), il serait intéressant d'effectuer des

transcriptions *in vitro* sur des matrices ayant des niveaux de surenroulement variables et de vérifier le statut de l'ARN et de la matrice ADN (hypersurenroulement). Puisque la longueur de l'ARN est importante pour générer de l'hypersurenroulement et que le R-loop est un moyen de contraindre ce dernier, est-ce que l'ARN (ou l'hypersurenroulement) devient de plus en plus résistant à l'action de la RNase A et de plus en plus sensible à la RNase HI au fur et à mesure que le surenroulement de la matrice transcrite augmente? De plus, est-ce que l'importance de la longueur de l'ARN varie en fonction du niveau de surenroulement de la matrice transcrite pour générer de l'hypersurenroulement? En d'autres mots, si la matrice transcrite est très surenroulée, est-ce que la transcription par la polymérase qui possède une mutation *rpoB108* peut générer de l'hypersurenroulement même en produisant des ARNs plus courts? Il serait également intéressant de vérifier l'influence des niveaux d'ATP sur la capacité de la gyrase à relaxer un substrat hypersurenroulé et de mieux caractériser le rôle de la RNase HI et de la gyrase, seules ou en collaboration, pour éliminer cette population de plasmides.

En conclusion, depuis sa découverte en 1971, nous avons fait d'énormes progrès dans la définition et précision des différentes fonctions de la topoisomérase I chez *E. coli*. L'importance du rôle de cette dernière dans la transcription est aujourd'hui indiscutable. Ceci est soutenu par le fait que tous les organismes vivants recensés à ce jour possèdent une topoisomérase de type IA. Malgré tous ces avancements, un bon nombre d'inconnues demeure par rapport aux conséquences de la perte de *topA* pour les cellules. Comment l'hypersurenroulement mène-t-il à la mort cellulaire? Est-ce qu'il cause une fragmentation du chromosome lors de la réplication? Est-ce qu'il compromet la synthèse protéique à un niveau qui est incompatible avec la croissance cellulaire? Dans quelles circonstances l'interaction de la topoisomérase I avec l'ARN polymérase est-elle essentielle? Est-ce pour cette raison que les divers supprimeurs multicopie isolés ne peuvent pas entièrement compenser pour la perte de *topA*? Il nous reste clairement beaucoup de travail à faire...

5. Bibliographie

- Adams, D. E., Shekhtman, E. M., Zechiedrich, E. L., Schmid, M. B. & Cozzarelli, N. R. (1992) The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*, **71**, 277- 288.
- Albrechtsen, B., Squires, C. L., Li, S. & Squires, C. (1990) Antitermination of characterized transcriptional terminators by the *Escherichia coli* *rrnG* leader region. *J. Mol. Biol.*, **213**, 123- 134.
- Albert, A. C., Spirito, F., Figueroa- Bossi, L. & Rahmouni, A. R. (1996) Hypernegative template DNA supercoiling during transcription of the tetracyclin- resistance gene in *topA* mutants is largely constrained *in vivo*. *Nucl. Ac. Res.*, **24**, 3093- 3099.
- Arnold, G. F. & Tessman, I. (1988) Regulation of DNA superhelicity by *rpoB* mutations that suppress defective Rho-mediated transcription termination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 4226- 4271.
- Baaklini, I., Rallu, F., Hraiky, C. & Drolet, M. (2003) RNase HI overproduction is required for efficient full- length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. Soumis pour publication.
- Baker, T. A., Sekimizu, K., Funnell, B. E. & Kornberg, A. (1986) Extensive unwinding of the plasmid template during staged enzymatic initiation of DNA replication from the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *Cell*, **45**, 53- 64.
- Baker, T. A., Funnell, B. E. & Kornberg, A. (1987) Helicase action of DnaB protein during replication from the *Escherichia coli* chromosomal origin *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6877- 6885.

- Baker, T. A. & Kornberg, A. (1988) Transcriptional activation of initiation of replication from the *E. coli* chromosomal origin: an RNA-DNA hybrid near *oriC*. *Cell*, **55**, 113- 123.
- Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. A. & Gourse, R. L. (2001) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, **305**, 673- 688.
- Bennett, R. J., Noirot- Gros, M. F. & Wang, J. C. (2000) Interaction between yeast Sgs1 helicase and DNA topoisomerase III. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26898-26905.
- Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P. C., Nicolas A. & Forterre, P. (1997) An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, **386**, 414- 417.
- Bliska, J. B. & Cozarelli, N. R. (1987) Use of site- specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism *in vivo*. *J. Mol. Biol.*, **194**, 205- 218.
- Bogenhagen, D. & Clayton, D. A. (1978a) Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: kinetics of synthesis and turnover of the initiation sequence. *J. Mol. Biol.*, **119**, 49- 68.
- Bogenhagen, D. & Clayton, D. A. (1978b) Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: introduction of superhelical turns into newly replicated molecules. *J. Mol. Biol.*, **119**, 69- 81.
- Bowater, R. P., Chen, D. & Lilley, D. M. J. (1994) Elevated unconstrained supercoiling of plasmid DNA generated by transcription and translation of

the tetracycline resistance gene in eubacteria. *Biochemistry*, **33**, 9266-9275.

Briebe, L. G., Gopal, V. & Sousa, R. (2001) Scanning mutagenesis reveals roles for helix n of the bacteriophage T7 RNA polymerase thumb subdomain in transcription complex stability, pausing, and termination. *J. Biol. Chem.*, **276**, 10306- 10313.

Broccoli, S., Phoenix, P. & Drolet, M. (2000) Isolation of the *topB* gene as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **35**, 58- 68.

Broccoli, S., Rallu, F., Sanscartier, P., Crouch, R. J. & Drolet, M. (2003) Mechanisms of transcription- induced hypernegative supercoiling in *topA* null mutants of *Escherichia coli*. Soumis pour publication.

Brown, W. M., Shine, J. & Goodman, H. M. (1978) Human mitochondrial DNA: analysis of 7S DNA from the origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 735- 739.

Cashel, M. (1969) The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*: IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3133- 3141.

Cashel, M. & Gallant, J. (1969) Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature*, **221**, 838- 841.

Cashel, M., Gentry, D. R., Hernandez, V. J. & Vinella, D. (1996) The stringent response. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F. C., Curtiss R., III, Ingraham, J. L., Lin, E. C. C.,

- Low, K. B., Magasanik, B., *et al.* (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 1458- 1496.
- Champoux, J. J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 369- 413.
- Chang, D. D. & Clayton, D. A. (1987) A novel endoribonuclease cleaves at a priming site of mouse mitochondrial DNA replication. *EMBO J.*, **6**, 409- 417.
- Chatterji, D. & Ohja, A. K. (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**, 160- 165.
- Chen, D., Bowater, R. & Lilley, D. M. J. (1994) Topological promoter coupling in *Escherichia coli*: $\Delta topA$ - dependant activation of the *leu-500* promoter on a plasmid. *J. Bacteriol.*, **176**, 3757- 3764.
- Chen, D. & Lilley, D. M. J. (1999) Transcription- induced hypersupercoiling of plasmid DNA. *J. Mol. Biol.*, **285**, 443- 448.
- Cheng, B., Zhu, C. X., Ji, C., Ahumada, A. & Tse- Dinh, Y. C. (2003a) Direct interaction between *E. coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Cheng, B., Rui, S., Ji, C., Gong, V. W., Van Dyk, T. K., Drolet, M & Tse-Dinh, Y. C. (2003b) RNase H overproduction allows the expression of stress-induced genes in the absence of topoisomerase I. *FEMS Microbiol. Lett.*, **221**, 237- 242.
- Clayton, D. A. & Smith, C. A. (1975) Complex mitochondrial DNA. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **14**, 1- 67.

- Clayton, D. A. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, **28**, 693-705.
- Clayton, D. A. (1984) Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 573- 594.
- Clayton, D. A. (1992) Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int. Rev. Cytol.* **141**, 217- 232.
- Condon, C., Squires, C. & Squires, C. L. (1995) Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **59**, 623- 645.
- Cook, D. N., Ma, D., Pon, N. G., & Hearst, J. E. (1992) Dynamics of DNA supercoiling by transcription in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 10603- 10607.
- Cortay, J. C. & Cozzone, A. J. (1983) Effects of aminoglycoside antibiotics on the coupling of protein and RNA syntheses in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **112**, 801- 808.
- Crews, S., Ojala, D., Posakony, J., Nishiguchi, J. & Attardi, G. (1979) Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication. *Nature*, **277**, 192- 198.
- Daube, S. & von Hippel, P. H. (1994) RNA displacement pathways during transcription from synthetic RNA-DNA bubble duplexes. *Biochemistry*, **33**, 340- 347.
- Dean, F. B., Krasnow, M. A., Otter, R., Matzuk, M. M., Spengler, S., Pastorcio, M. & Cozzarelli, N. R. (1983) *Escherichia coli* type I topoisomerases:

identification, mechanism and role in recombination. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, **47**, 769- 777.

Dekker, N. H., Rybenkov, V. V., Duguet, M., Crisona, N. J., Cozzarelli, N. R., Bensimon, D. & Croquette, V. (2002) The mechanism of type IA topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 12126- 12131.

De Massy, B., Fayet, O. & Kogoma, T. (1984a) Multiple origin usage for DNA replication in *sdrA* (*rnhA*) mutants of *Escherichia coli* K-12: initiation in the absence of *oriC*. *J. Mol. Biol.*, **178**, 227- 236.

De Massy, B., Pattie, J., Louarn, J. M. & Bouche, J. P. (1984b) *oriX*: a new replication origin in *E. coli*. *Cell*, **36**, 221- 227.

DiGate, R. J. & Marians, K. J. (1988) Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 13366- 13373.

DiGate, R. J. & Marians, K. J. (1989) Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17924- 17930.

DiNardo, S., Voelkel, K. A., Sternglanz, R., Reynolds, A. E. & Wright, A. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*, **31**, 43- 51.

Di Noia, J. & Neuberger, M. S. (2002) Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase. *Nature*, **419**, 43- 48.

Dorman, C. J., Lynch, A. S., Ni Bhrian, N. and Higgins, C. F. (1989) DNA supercoiling in *Escherichia coli*: *topA* mutations can be suppressed by

DNA amplifications involving the *tolC* locus. *Mol. Microbiol.*, **3**, 531-540.

Drlica, K. & Snyder, M. (1978) Superhelical *Escherichia coli* DNA: relaxation by coumermycin. *J. Mol. Biol.*, **120**, 145- 154.

Drlica, K. (1984) Biology of bacterial deoxyribonucleic acid topoisomerases. *Microbiol. Rev.*, **48**, 273- 289.

Drlica, K. & Riley, M. (1990) « The Bacterial Chromosome. » American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Drlica, K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.*, **6**, 425-433.

Drolet, M., Bi, X. & Liu, L. F. (1994) Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2068- 2074.

Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, É., Liu, L. F., & Crouch, R. J. (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* $\Delta topA$ mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 3526- 3530.

Drolet, M., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., Fortin, C., Massé, E. & Baaklini, I. (2003) The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front. Biosci.*, **8**, 210- 221.

- Dunnick, W. A., Hertz, G. Z., Scappino, L. & Gritzmacher, C. (1993) DNA sequence at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucl. Ac. Res.*, **21**, 365- 372.
- Espeli, O., Levine, C., Hassing, H. & Marians, K. J. (2003) Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Mol. Cell*, **11**, 189- 201.
- Esposito, F. & Sinden, R. R. (1988) DNA supercoiling and eukaryotic gene expression. *Oxford Surv. Euk. Genes*, **5**, 1- 50.
- Franco, R. J. & Drlica, K. (1989) Gyrase inhibitors can increase *gyrA* expression and DNA supercoiling. *J. Bacteriol.*, **171**, 6573- 6579.
- Free, A. & Dorman, C. J. (1994) *Escherichia coli tyrT* gene transcription is sensitive to DNA supercoiling in its native chromosomal context: effect of DNA topoisomerase IV overexpression on *tyrT* promoter function. *Mol. Microbiol.*, **14**, 151- 161.
- Freeman, L. A. & Gerrard, W. T. (1992) DNA supercoiling in chromatin structure and gene expression. *Crit. Rev. Euk. Gene Exp.*, **2**, 165- 209.
- Fuller, R. S. & Kornberg, A. (1983) Purified DnaA protein in initiation of replication at the *Escherichia coli* chromosomal origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, **80**, 5817- 5821.
- Fuller, R. S., Funnell, B. E. & Kornberg, A. (1984) The DnaA protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. *Cell*, **38**, 889- 900.

- Funnell, B. E., Baker, T. A., & Kornberg, A. (1986) Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol.Chem.*, **261**, 5616- 5624.
- Funnell, B. E., Baker, T. A. & Kornberg, A. (1987) *In vitro* assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.*, **262**, 10327- 10334.
- Gangloff, S., McDonald, J. P., Bendixen, C., Arthur, L. & Rothstein, R. (1994) The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 8391- 8398.
- Gausing, K. (1980) Regulation of ribosome production in *Escherichia coli*: synthesis and stability of ribosomal RNA and of ribosomal protein messenger RNA at different growth rates. *J. Mol. Biol.* **115**, 335- 354.
- Gellert, M., O'Dea, K., Mizuuchi, K. & Nash, H. (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 3872- 3876.
- Gellert, M., Menzel, R., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H. & Friedman, D. I. (1983) Regulation of DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **47**, 763- 767.
- Gopal, V., Briebe, L. G., Guajardo, R., McAllister, W. T. & Sousa, R. (1999) Characterization of structural features important for T7 RNAP elongation complex stability reveals competing complex conformations and a role for the non- template strand in RNA displacement. *J. Mol. Biol.*, **290**, 411- 431.

- Griffith, J. D. (1976) Visualization of prokaryotic DNA in a regularly condensed chromatin- like fiber. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 563- 567.
- Gritzmacher, C. A. (1989) Molecular aspects of heavy- chain class switching. *Crit. Rev. Immunol.*, **9**, 173- 200.
- Groisman, E. A., Castilho, B. A. & Casadaban, M. J. (1984) *In vivo* cloning and adjacent gene fusing with a mini-Mu-*lac* bacteriophage containing a plasmid replicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 1480- 1483.
- Grossman, L. I., Watson, R. & Vinograd, J. (1973) The presence of ribonucleotides in mature closed- circular mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 3339- 3343.
- Harinarayanan, R. & Gowrishankar, J. (2003) Host factor titration by chromosomal R-loops as a mechanism for runaway plasmid replication in transcription termination- defective mutants of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **332**, 31- 46.
- Harmon, F. G., Di Gate, R. J. & Kowalczykowski, S., (1999) RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol. Cell*, **3**, 611- 620.
- Harshman, R. B. & Yamazaki, H. (1971) Formation of ppGpp in a relaxed and stringent strain of *Escherichia coli* during diauxic lag. *Biochemistry*, **10**, 3980- 3982.
- Helmstetter, C. E. (1987) Timing of synthetic activities in the cell cycle. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*:

cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 15656- 15661.

Hernandez, J. V. & Bremer, H. (1991) *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires *spoT*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 5991- 5999.

Hiasa, H., DiGate, R. J. and Marians, K. J. (1994) Decatenating activity of *E. coli* DNA gyrase and topoisomerase I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **269**: 2093-2099.

Hiraga, S., Ichinose, C., Niki, H., Yamazoe, M. (1998) Cell cycle- dependent duplication and bidirectional migration of SeqA- associated DNA- protein complexes in *E. coli*. *Mol. Cell*, **1**, 381- 387.

Hraiky, C., Raymond, M.-A. & Drolet, M. (2000) RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 11257- 11263.

Hsieh, L. S., Burger, R. M., & Drlica, K. (1991) Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP]. Changes associated with a transition to anaerobic growth. *J. Mol. Biol.*, **219**, 443- 450.

Itoh, T & Tomizawa, J. (1979) Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA polymerase, ribonuclease H, and DNA polymerase I. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, **43**, 409- 417.

Itoh, T. & Tomizawa, J. (1980) Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 2450- 2454.

- Itoh, T. & Tomizawa, J. (1982) Purification of ribonuclease H as a factor required for initiation of *in vitro* ColE1 DNA replication. *Nucl. Ac. Res.*, **10**, 5949-5965.
- Jerome, L. J., van Biesen, T. & Frost, L. S. (1999) Degradation of FinP antisense RNA from F- like plasmids: the RNA- binding protein, FinO, protects FinP from ribonuclease E. *J. Mol. Biol.*, **285**, 1457- 1473.
- Jin, D. J, Walter, W. A. & Gross, C. A. (1988) Characterization of the termination phenotypes of rifampicin- resistant mutants. *J. Mol. Biol.*, **202**, 245- 253.
- Jores, L. & Wagner, R. (2003) Essential steps in the ppGpp- dependent regulation of bacterial ribosomal RNA promoters can be explained by substrate competition. *J. Biol. Chem.*, **278**, 16834- 16843.
- Kaguni, J. M & Kornberg, A (1984) Topoisomerase I confers specificity in enzymatic replication of the *Escherichia coli* chromosomal origin. *J. Biol. Chem.*, **259**, 8578- 8583.
- Kalinowski, D. P., Illenye, S. & Van Houten, B. (1992) Analysis of DNA damage and repair in murine leukemia L1210 cells using a quantitative polymerase chain reaction assay. *Nucl. Ac. Res.*, **20**, 3485- 3494.
- Kampranis, S. C. & Maxwell, A. (1996) Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 14416- 14421.
- Karahalil, B., de Sousa- Pinto, N. C., Parsons, J. L., Elder, R. H. & Bohr, V. A. (2003) Compromised incision of oxidized pyrimidines in liver mitochondria of mice deficient in NTH1 and OGG1 glycosylases. *J. Biol. Chem.*, **278**, 33701-33707.

- Kato, J., Nishimura, Y., Yamada, M., Suzuki, H. & Hirota, Y. (1988) Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 3967- 3977.
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S. & Suzuki, H. (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*, **63**, 393- 404.
- Kinoshita, K. & Honjo, T. (2000) Unique and unprecedented recombination mechanisms in class switching. *Curr. Opin. Immunol.*, **12**, 195- 198.
- Kirkegaard, K. & Wang, J. C. (1985) Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single- stranded loop. *J. Mol. Biol.*, **185**, 625- 637.
- Kogoma, T. (1978) A novel *Escherichia coli* mutant capable of DNA replication in the absence of protein synthesis. *J. Mol. Biol.*, **121**, 55- 69.
- Kogoma, T., Torrey, T. A., Subia, N. L. & Pickett, G. G. (1981) An alternative DNA initiation pathway in *E. coli*. *ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.*, **22**, 361-374.
- Kogoma, T. & von Meyenburg, K. (1983) The origin of replication *oriC* and the DnaA protein are dispensable in stable DNA replication (*sdrA*) mutants of *Escherichia coli* K-12. *EMBO J.*, **2**, 463- 368.
- Kogoma, T. (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 212- 238.

- Kohara, Y., Akiyama, K. and Isono, K. (1987) The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell*, **50**: 495- 508.
- Kornberg, A. & Baker, T. A. (1992) "DNA Replication" Second Edition; W.H. Freeman and Company, USA.
- Krasilnikov, A. S., Podtelezhnikov, A., Vologodskii, A. & Mirkin, S. M. (1999) Large- scale effects of transcriptional DNA supercoiling *in vivo*. *J. Mol. Biol.*, **292**, 1149- 1160.
- Kushner, S. R. (2002) mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *J. Bacteriol.*, **184**, 4658- 4665.
- Kuzminov, A. (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 751- 813.
- Lagosky, P. & Chang, F. (1980) Influence of amino acid starvation on guanosine 5'-diphosphate, 3'- diphosphate basal level synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **144**, 499- 508.
- Lang, B. F., Gray, M. W. & Burger, G. (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, **33**, 351- 397.
- Lazzarini, R., Cashel, M. & Gallant, J. (1971) On the regulation of guanosine tetraphosphate levels in stringent and relaxed strains of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **246**, 4381- 4385.
- Lee, E. H., Masai, H., Allen, G. C. & Kornberg, A. (1990) The *priA* gene encoding the primosomal replicative n' protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 4620- 4624.

- LeDoux, S. P., Wilson, G. L., Beecham, E. J., Stevnsner, T., Wasserman, K. & Bohr, V. A. (1992) Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*, **13**, 1967-1973.
- Leng, F. & McMacken, R. (2002) Potent stimulation of transcription- coupled DNA supercoiling by sequence- specific DNA- binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 9139- 9144.
- Lesley, S. A, Jovanovich, S. B., Tse- Dinh, Y. C. & Burgess, R. R. (1990) Identification of a heat- shock promoter in the *topA* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **172**, 6871- 6874.
- Lieber, M. R. (1991) Site- specific recombination in the immune system. *FASEB*, **5**, 2934- 2944.
- Lieber, M. R. (1998) Pathologic and physiologic double- strand breaks: roles in cancer, aging, and the immune system. *Am. J. Path.*, **153**, 1323- 1332.
- Liu, L. F. & Wang, J. C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 7024- 7027.
- Liu, B. & Alberts, B. M. (1995) Head- on collision between a DNA replication apparatus and RNA polymerase transcription complex. *Science*, **267**, 1131- 1137.
- Liu, J. & Marians, J. K. (1999) PriA- directed assembly of a primosome on D-loop DNA. *J. Biol. Chem.*, **274**, 25033- 25041.

- Løbner- Olesen, A., Marinus, M. G & Hansen, F. G. (2003) Role of SeqA and Dam in *Escherichia coli* gene expression: A global/microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 4672- 4677.
- Lodge, J. K., Kazik, T., & Berg, D. E. (1989) Formation of supercoiling domains in plasmid pBR322. *J. Bacteriol.*, **171**, 2181- 2187.
- Lopez, P. J., Marchand, I., Yarchuk, O. & Dreyfus, M. (1998) Translation inhibitors stabilize *Escherichia coli* mRNAs independently of ribosome protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 6067- 6072.
- Low, R. L., Shlomai, J. & Kornberg, A. (1982) Protein n, a primosomal DNA replication protein of *Escherichia coli*. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, **257**, 6242- 6250.
- Lynch, A. S. & Wang, J. C. (1993) Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in topoisomerase I. *J. Bacteriol.*, **175**, 1645- 1655.
- Ma, D., Cook, D. N., Pon, N. G. & Hearst, J. E. (1994) Efficient anchoring of RNA polymerase in *Escherichia coli* during coupled transcription-translation of genes encoding integral inner membrane polypeptides. *J. Biol. Chem.*, **269**, 15362- 15370.
- Manes, S. H., Pruss, G. J. & Drlica, K. (1983) Inhibition of RNA synthesis by oxolinic acid is unrelated to average DNA supercoiling. *J. Bacteriol.*, **155**, 420- 423.

- Marians, K. J., Minden, J. S. & Parada, C. (1986) Replication of superhelical DNAs *in vitro*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **33**, 111- 140.
- Massé, É., Phoenix, P. & Drolet, M. (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12816- 12823.
- Massé, É. & Drolet, M. (1999a) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription- induced negative supercoiling. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16659- 16664.
- Massé, É. & Drolet, M. (1999b) Relaxation of transcription- induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16654- 16658.
- Massé, É. & Drolet, M. (1999c) R-loop- dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J. Mol. Biol.*, **294**, 321- 332.
- Masters, B. S., Stohl, L. L. & Clayton, D. A. (1987) Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell*, **51**, 89- 99.
- McCairn, E., Ni Bhrian, N. and Dorman, C. J. (1995) Overexpression of the *Shigella flexneri* genes coding for DNA topoisomerase IV compensates for loss of DNA topoisomerase I: effect on virulence gene expression. *Mol. Microbiol.* **15**, 507- 517.
- Miller, J. H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Neidhardt, F. C.,

- Bloch, P. L. & Smith, D. F. (1974) Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol.*, **119**, 736- 747.
- Mizuuchi, K, Gellert, M. & Nash, H. A. (1978) Involvement of supertwisted DNA in integrative recombination of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.*, **121**, 375- 392.
- Mukherjee, S., Briebe, L. G. & Sousa, R. (2002) Structural transitions mediating transcription initiation by T7 RNA polymerase. *Cell*, **110**, 81- 91.
- Murray, D. K. & Bremer, H. (1996) Control of *spoT*- dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **259**, 41- 57.
- Muto, A., Kimura, A. & Osawa, S. (1975) Effects of some antibiotics on the stringent control of RNA synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **139**, 321- 327.
- Nash, H. A. (1990) Bending and supercoiling of DNA at the attachment site of bacteriophage lambda. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 222- 227.
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L. & Smith, D. F. (1974) Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol.*, **119**, 736- 747.
- Ng, J. Y. & Mariani, K. J. (1996a) The ordered assembly of the phiX174-type primosome. I. Isolation and identification of intermediate protein- DNA complexes. *J. Biol. Chem.*, **271**, 15642- 15648.
- Ng, J. Y. & Mariani, K. J. (1996b) The ordered assembly of the phiX174- type primosome. II. Preservation of primosome composition from assembly through replication. *J. Biol. Chem.*, **271**, 15649- 15655.

- Noël, G. and Drapeau, G. (1986) Identification of new cell division genes in *Escherichia coli* by using extragenic suppressors. *J. Bacteriol.*, **165**, 399-404.
- Nordström, K. & Dasgupta, S. (2001) Partitioning of the *Escherichia coli* chromosome: superhelicity and condensation. *Biochimie*, **83**, 41- 48.
- Nurse, P., Levine, C., Hassing, H. & Marians, K. J. (2003) Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 8653- 8660.
- Ogawa, T., Pickett, G. G., Kogoma, T. & Kornberg, A. (1984) RNase H confers specificity in the *dnaA*-dependent initiation of replication at the unique origin of the *Escherichia coli* chromosome *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 1040- 1044.
- Ogawa, T., Baker, T. A., van der Ende, A. & Kornberg, A. (1985) Initiation of enzymatic replication at the origin of the *Escherichia coli* chromosome: contributions of RNA polymerase and primase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 3562- 3566.
- Ojala, D. & Attardi, G. (1977) A detailed physical map of HeLa cell mitochondrial DNA and its alignment with the position of known genetic markers. *Plasmid*, **1**, 78- 105.
- Ojala, D. & Attardi, G. (1978) Precise localization of the origin of replication in a physical map of HeLa cell mitochondrial DNA and isolation of a small fragment that contains it. *J. Mol. Biol.*, **122**, 301- 319.
- Oka, A., Sugimoto, K., Takanami, M., Hirota, Y. (1980) Replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome: the size and structure of the minimum

DNA segment carrying the information for autonomous replication. *Mol. Gen. Genet.*, **178**, 9- 20.

Ostrander, E. A., Benedetti, P & Wang, J. C. (1990) Template supercoiling by a chimera of yeast GAL4 protein and phage T7 RNA polymerase. *Science*, **249**, 1261- 1265.

Pascucci, B. Versteegh, A, van Hoffen, A., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H. F. & Dogliotti, E (1997) DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, **273**, 417- 427.

Peng, H. & Marians, K. J. (1993a) *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J. Biol. Chem.*, **268**, 24481- 24490.

Peng, H. & Marians, K. J. (1993b) Decatenation activity of topoisomerase IV during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 8571- 8575.

Petersen- Mahrt, S. K., Harris, R. S. & Neuberger, M. S. (2002) AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature*, **418**, 99- 103.

Petes, T. D. (1979) Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 410- 414.

Pettijohn, D. E. & Pfenninger, O. (1980) Supercoils in prokaryotic DNA restrained *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 1331- 1335.

Pettijohn, D. E. & Sinden, R. R. (1985) Structure of the isolated nucleoid. In «Molecular Cytology of *E. coli*.» (N. Nanninga, ed.) pp. 199- 227.

- Phoenix, P., Raymond, M.- A., Massé, É. & Drolet, M. (1997) Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 1473- 1479.
- Postow, L., Crisona, N. J., Peter, B. J., Hardy, C. D., & Cozzarelli, N. R. (2001) Topological challenges to DNA replication: Conformations at the fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 8219- 8226.
- Pruss, G. J., Manes, S. H. & Drlica, K. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell*, **31**, 35- 42.
- Pruss, G.J. (1985) DNA topoisomerase I mutants: increased heterogeneity in linking number and other replicon-dependent changes in dNA supercoiling. *J. Mol. Biol.*, **185**, 51- 63.
- Pruss, G. J. & Drlica, K. (1986) Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracyclin affects plasmid DNA supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 8952- 8956.
- Pruss, G. J. & Drlica, K. (1989) DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell*, **56**, 521- 523.
- Qi, H., Menzel, R. & Tse- Dinh, Y. C. (1996) Effect of the deletion of the sigma 32-dependent promoter (P1) of the *Escherichia coli* topoisomerase I gene on thermotolerance. *Mol. Microbiol.*, **21**, 703- 711.
- Qi, H., Menzel, R. & Tse- Dinh, Y. C. (1997) Regulation of *Escherichia coli topA* gene transcription: involvement of a sigma S- dependent promoter. *J. Mol. Biol.*, **267**, 481- 489.

- Raji, A., Zabel, D. J. Laufer, C. S. and Depew, R. E. (1985) Genetic analysis of mutations that compensate for loss of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Bacteriol.*, **162**, 1173- 1179.
- Ramiro, A. R., Stavropoulos, P., Jankovic, M. & Nussenzweig, M. C. (2003) Transcription enhances AID- mediated cytidine deamination by exposing single- stranded DNA on the nontemplate strand. *Nature Immunol.*, **4**, 452- 456.
- Reaban, M. E. & Griffin, J. A. (1990) Induction of RNA- stabilized DNA conformers by transcription of an immunoglobulin switch region. *Nature*, **348**, 342- 344.
- Reaban, M. E., Lebowitz, J. & Griffin, J. A. (1994) Transcription induces the formation of stable RNA-DNA hybrid in the immunoglobulin α switch region. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21850- 21857.
- Reece, R. J. & Maxwell, A. (1991) DNA gyrase : Structure and function. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **26**, 335- 375.
- Richardson, J. P. (1975) Attachment of nascent RNA molecules to superhelical DNA. *J. Mol. Biol.*, **98**, 565- 579.
- Richardson, S. M. Higgins, C. F. & Lilley, D. M. J. (1984) The genetic control of DNA supercoiling in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.*, **3**, 1745- 1752.
- Rivetti, C., Codeluppi, S., Dieci, G. & Bustamante, C. (2003) Visualizing RNA extrusion and DNA wrapping in transcription elongation complexes of bacterial and eukaryotic RNA polymerases. *J. Mol. Biol.*, **326**, 1413- 1426.

- Roberts, R. W. & Crothers, D. M. (1992) Stability and properties of double and triple helices: dramatic effects of RNA or DNA backbone composition. *Science*, **258**, 1463- 1465.
- Ryals, J., Little, R. & Bremer, H. (1982) Control of rRNA and tRNA syntheses in *Escherichia coli* by guanosine tetraphosphate. *J. Bacteriol.*, **151**, 1261-1268.
- Sakakibara, Y. & Tomizawa, J. (1974a) Replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 802- 806.
- Sakakibara, Y. & Tomizawa, J. (1974b) Replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extracts. II. Selective synthesis of early replicative intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 1403- 1407.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawitzke, J. & Austin, S. (2001) An analysis of the factory model for chromosome replication and segregation in bacteria. *Mol. Microbiol.*, **40**, 786- 794.
- Schneider, D. A., Gaal, T & Gourse, R. L. (2002) NTP- sensing by rRNA promoters in *Escherichia coli* is direct. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 8602- 8607.
- Schofield, M. A., Agbung, R., Michaels, M. L. & Miller, J. H. (1992) Cloning and sequencing of *Escherichia coli mutR* shows its identity to *topB*, encoding topoisomerase III. *J. Bacteriol.*, **174**, 5168- 5170.

- Sekimizu, K., Bramhill, D. & Kornberg, A. (1987) ATP activates DnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell*, **50**, 259- 265.
- Selzer, G. & Tomizawa, J. (1982) Specific cleavage of the p15A primer precursor by ribonuclease H at the origin of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 7082- 7086.
- Shimamoto, A., Nishikawa, K., Kitao, S. & Furuichi, Y. (2000) Human RecQ5 β , a large isomer of RecQ5 DNA helicase, localizes in the nucleoplasm and interacts with topoisomerases 3 α and 3 β . *Nucl. Ac. Res.*, **28**, 1647- 1655.
- Shlomain, J. & Kornberg, A. (1980a) A prepriming DNA replication enzyme of *Escherichia coli*. I. Purification of protein n': a sequence-specific, DNA-dependent ATPase. *J. Biol. Chem.*, **255**, 6789- 6793.
- Shlomain, J. & Kornberg, A. (1980b) A prepriming DNA replication enzyme of *Escherichia coli*. II. Actions of protein n': a sequence-specific, DNA-dependent ATPase. *J. Biol. Chem.*, **255**, 6794- 6798.
- Shuster, R. C., Rubenstein, A. J. & Wallace, D. C. (1988) Mitochondrial DNA in anucleated human blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**, 1360-1365.
- Sinclair, D. A. & Guarente, L. (1997) Extrachromosomal rDNA circles- a cause of aging in yeast. *Cell*, **91**, 1033- 1042.
- Sinden, R. R., Carlson, J. & Pettijohn, E. (1980) Torsional tension in the DNA double helix measured with trimethylpsoralen in living *E. coli* cells. *Cell*, **21**, 773- 783.

- Sinden, R. R. (1994) "DNA Structure and Function", Academic Press, San Diego, California.
- Spirito, F., Figueroa- Bossi, N. & Bossi, L. (1994) The relative contributions of transcription and translation to plasmid DNA supercoiling in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.*, **11**, 111- 122.
- Squires, C. L., Greenblatt, J., Li, J., Condon, C. & Squires, C. (1993) Ribosomal RNA antitermination *in vitro*: requirement for Nus factors and one or more unidentified cellular components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 970- 974.
- Srivastava, A. K. & Schlessinger, D. (1990) Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Ann. Rev. Microbiol.*, **44**, 105- 129.
- Srivenugopal, K. S., Lockshon, D. & Morris, D. R. (1984) *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme. *Biochemistry*, **23**, 1899- 1906.
- Staudenbauer, W. L. (1977) Replication of the ampicillin- resistance plasmid RSF1030 in extracts of *Escherichia coli*: separation of the replication cycle into early and late stages. *Mol. Gen. Genet.*, **156**, 27- 34.
- Stavneser, J. (1996) Antibody class- switching. *Adv. Immunol.*, **61**, 79- 146.
- Steck, T. R., Pruss, G. J., Manes, S. H., Burg, L. & Drlica, K. (1984) DNA supercoiling in gyrase mutants. *J. Bacteriol.*, **158**, 397- 403.
- Sternglanz, R., DiNardo, S., Voelkel, K. A., Nishimura, Y., Hirota, Y., Becherer, K., Zumstein, L. & Wang, J. C. (1981) Mutations in the gene coding for

Escherichia coli DNA topoisomerase I affect transcription & transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 2747- 2751.

Stewart, L., Redinbo, M. R., Qiu, X., Hol, W. G. & Champoux, J. J. (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*, **279**, 1534-1541.

Stojanovski, D., Johnston, A. J., Streimann, I., Hoogenraad, N. J. & Ryan, M. T. (2003) Import of nuclear- encoded proteins into mitochondria. *Exp. Physiol.*, **88**, 57- 64.

Stoker, N. G., Fairweather, N. F. and Spratt, B. G. (1982) Versatile low- copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene*, **18**: 335-341.

Stonington, O. G. & Pettijohn, D. E. (1971). The folded genome of *Escherichia coli* isolated in a protein- DNA-RNA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **68**, 6- 9.

Takeuchi, Y., Horiuchi, T. & Kobayashi, T. (2003) Transcription- dependent recombination and the role of fork collision in yeast DNA. *Genes & Dev.*, **17**, 1497- 1506.

Tomizawa, J. , Sakakibara, Y. & Kakfuda, T. (1974) Replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extracts. Origin and direction of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 2260- 2264.

Tomizawa, J. I., Ohmori, H. & Bird, R. E. (1977) Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, **74**, 1865- 1869.

- Torrey, T. A., Atlung, T. & Kogoma, T. (1984) *dnaA* suppressor (*dasF*) mutants of *Escherichia coli* are stable DNA replication (*sdrA/rnh*) mutants. *Mol. Gen. Genet.*, **196**, 350- 355.
- Trigueros, S. & Roca, J. (2002) Failure to relax negative supercoiling of DNA is a primary cause of mitotic hyper- recombination in topoisomerase- deficient yeast cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 37207- 37211.
- Trucksis, M. & Depew, R. E. (1981) Identification and localization of a gene that specifies production of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 2164- 2168.
- Tsao, Y. P., Wu, H.-Y. & Liu, L. F. (1989) Transcription- driven supercoiling of DNA: Direct biochemical evidence from *in vitro* studies. *Cell*, **56**, 111- 118.
- Tse- Dinh, Y.- C. (1998) Bacterial and archeal type I topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**, 19-27.
- van Workum, M., van Dooren, S. J., Oldenburg, N., Molenaar, D., Jensen, P. R., Snoep, J. L. & Westerhoff, H. V. (1996) DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **20**, 351- 360.
- Viguera, E., Hernandez, P., Krimer, D. B., Lurz, R. & Schvartzman, J. B. (2000) *Nucl. Ac. Res.*, **28**, 498- 503.
- Vogel, U. & Jensen, K. F. (1995) Effects of the antiterminator BoxA on transcription elongation kinetics and (p)ppGpp inhibition of transcription elongation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18335- 18340.

- Von Wright, A. & Bridges, B. (1981) Effect of *gyrB*-mediated changes in chromosome structure on killing of *Escherichia coli* by ultraviolet light: experiments with strains differing in deoxyribonucleic acid repair capacity. *J. Bacteriol.*, **146**, 18- 23.
- Wagner, R. (2002) Regulation of ribosomal RNA synthesis in *E. coli*: effects of the global regulator guanosine tetraphosphate (ppGpp). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 331- 340.
- Wang, J. C. (1971) Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein. *J. Mol. Biol.*, **55**, 523- 533.
- Wang, J. C. (1996) DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.*, **65**, 635- 692.
- Wang, J. C. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews*, **3**, 430- 440.
- Wassarman, K. M. & Storz, G. (2000) 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell*, **101**, 613- 623.
- Weinreich, M. D., Yigit, H. and Reznikoff, W. R. (1994) Overexpression of the Tn5 transposase in *Escherichia coli* results in filamentation, aberrant nucleoid segregation and cell death: analysis of *E. coli* and transposase suppressor mutations. *J. Bacteriol.*, **176**, 5494- 5504.
- Weisner, R. J., Ruegg, J. C. & Morano, I. (1992) Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction, copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem. Biophys. Acta*, **183**, 553-559.

- Weitao, T., Nordstrom, K., & Dasgupta, S. (1999) Replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extracts. Origin and direction of replication. *Mol. Microbiol.*, **34**, 157- 168.
- Westerhoff, H. V., O'Dea, M. H., Maxwell, A. & Gellert, M. (1988) DNA supercoiling by DNA gyrase. A static head analysis. *Cell Biophys.*, **12**, 157- 181.
- Wigley, D.B. (1995) Structure and mechanism of DNA gyrase. In *Nucleic Acids and Molecular Biology* (Eckstein, F. & Lilley, D. M. J., eds), vol.9, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 165- 176.
- Wong, T. W. & Clayton, D. A. (1985) *In vitro* replication of human mitochondrial DNA: accurate initiation at the origin of light- strand synthesis. *Cell*, **42**, 951- 958.
- Wong- Staal, F., Mendelsohn, J. & Gouliau, M. (1973) Ribonucleotides in closed circular mitochondrial DNA from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 140- 148.
- Worcel, A & Burgi, E. (1972) On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **71**, 127- 147.
- Wu, H.- Y., Shyy, S., H., Wang, J. C. & Liu, L. F. (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*, **53**, 433- 440.
- Wu, L., Davies, S. L., North, P. S., Goulaouic, H., Riou, J. F., Turley, H., Gatter, K. C. & Hickson, I. D. (2000) The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *J. Biol. Chem.*, **275**, 9636- 9644.

- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G. & Cashel, M. (1991) Residual Guanosine 3',5'- Bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem.*, **266**, 5980- 5990
- Xu, B. & Clayton, D. A. (1996) RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy- strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA-DNA hybrids serving as primers. *EMBO J.*, **15**, 3135- 3143.
- Yang, M. Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H. T. & Holt, I. J. (2002) Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand- asymmetric DNA replication. *Cell*, **111**, 495-505.
- Yigit, H. & Reznikoff, W. S. (1997) Examination of the Tn5 transposase overproduction phenotype in *Escherichia coli* and localization of a suppressor of transposase overproduction killing that is an allele of *rpoH*. *J. Bacteriol.*, **179**, 1704- 1713.
- Yigit, H. & Reznikoff, W. S. (1998) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I and suppression of killing by Tn5 transposase overproduction: topoisomerase I modulates Tn5 transposition. *J. Bacteriol.*, **180**, 5866- 5874.
- Yigit, H. & Reznikoff, W. S. (1999) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I copurifies with Tn5 transposase, and Tn5 transposase inhibits topoisomerase I. *J. Bacteriol.*, **181**, 3185- 3192.
- Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C. L., Wilson, T. E. & Lieber, M. R. (2003) R-loops at immunoglobulin class- switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nature Immunol.*, **4**, 442- 450.

- Zechiedrich, E. L, Khodursky, A. B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D. Lilley, D. M. & Cozzarelli, N. R. (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady- state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8103- 8113.
- Zhu, Q., Pongpech, P. & DiGate, R.J. (2001) Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 9766- 9771.

6. Annexe

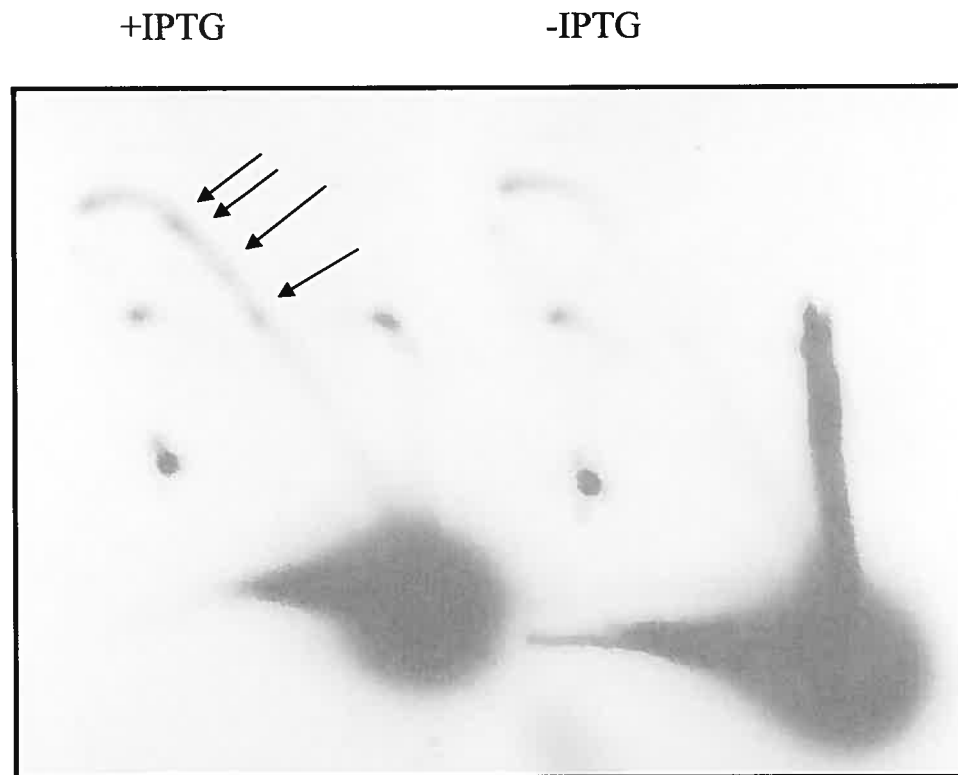


Figure 1A. La transcription du fragment *Hind*III de *rrnB* cause des blocages de la fourche de réplication sur le plasmide qui le porte. Le plasmide pMD306, un dérivé de pTrc99a portant le fragment *Hind*III de l'opéron *rrnB* dans l'orientation physiologique, a été transformé chez le mutant $\Delta topA$ (RFM475). La transcription du fragment *Hind*III de *rrnB* a été induite en ajoutant de l'IPTG. Les plasmides extraits ont été analysés par électrophorèse en 2 dimensions afin de visualiser les intermédiaires de la réplication. Les flèches désignent une accumulation d'intermédiaires de la réplication qui reflètent des blocages de la fourche de réplication.

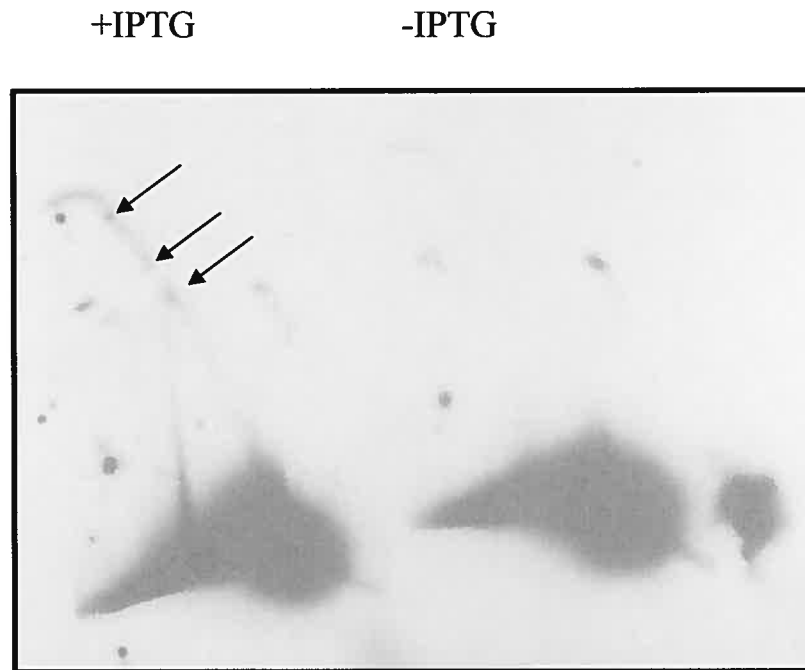


Figure 1B. La transcription du fragment *HindIII* de *rrnB* cause des blocages de la fourche de réplication sur le plasmide qui le porte. Le plasmide pMD308, un dérivé de pTrc99a portant le fragment *HindIII* de l'opéron *rrnB* dans l'orientation inversée, a été transformé chez le mutant $\Delta topA$ (RFM475). La transcription du fragment *HindIII* de *rrnB* a été induite en ajoutant de l'IPTG. Les plasmides extraits ont été analysés par électrophorèse en 2 dimensions afin de visualiser les intermédiaires de la réplication. Les flèches désignent une accumulation d'intermédiaires de la réplication qui reflètent des blocages de la fourche de réplication.

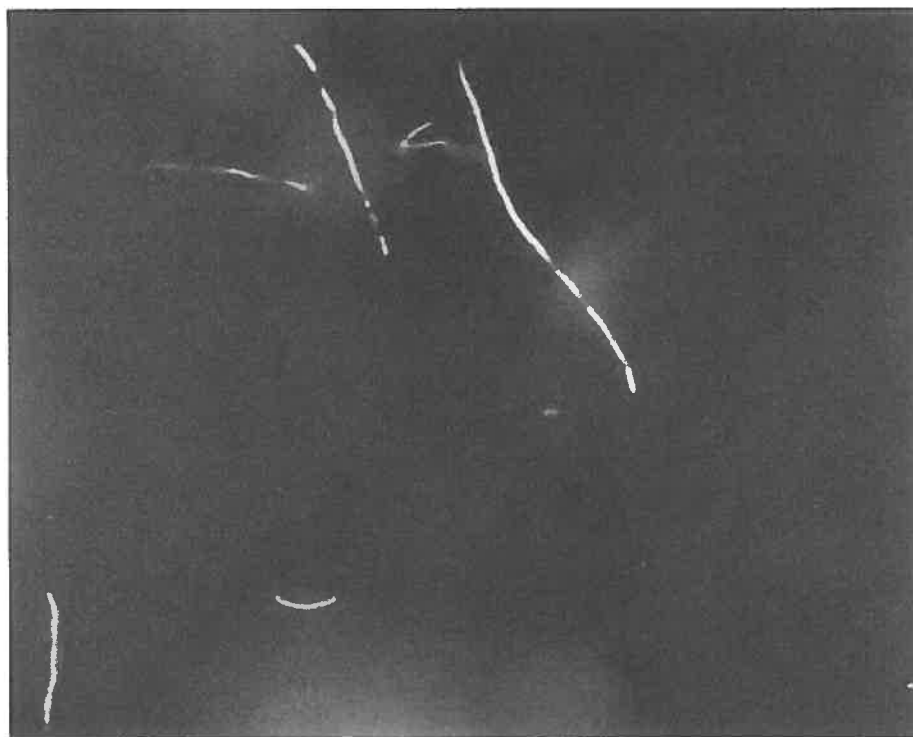


Figure 2. Photographie de cellules $\Delta topA \Delta rnhA$ (mutant conditionnel, souche SB383) tel qu'observé par microscopie à fluorescence. Les cellules ont été cultivées à 37°C dans un milieu riche, lavées, et colorées au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

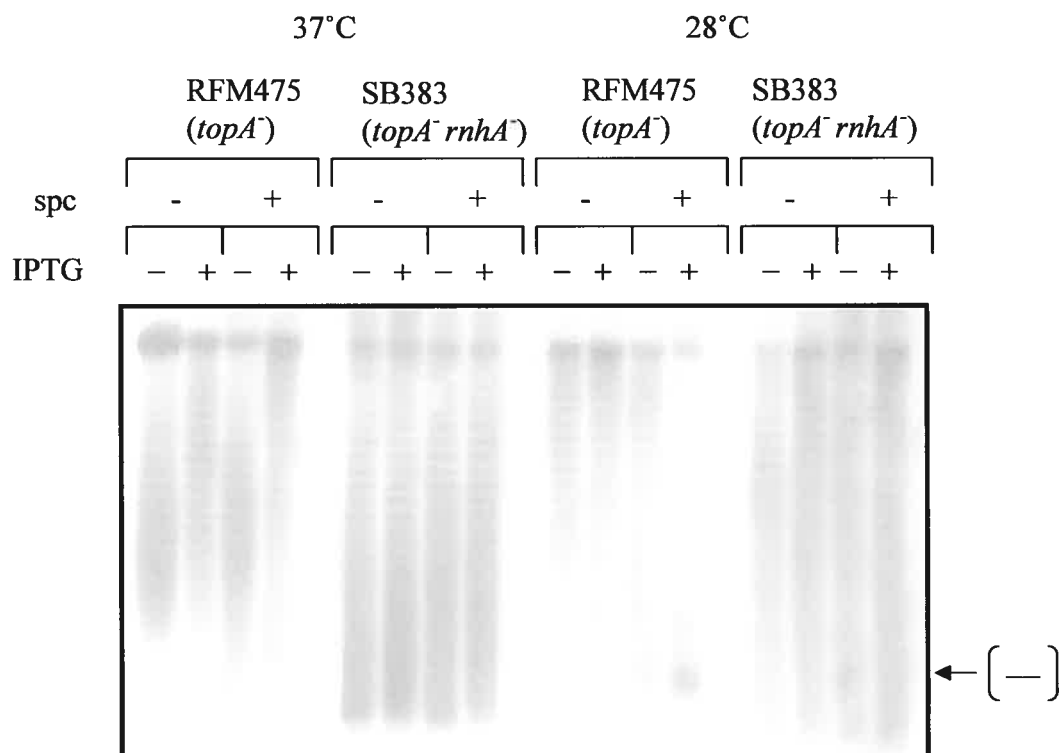


Figure 3. Extractions topologiques du plasmide pPH1243 (gène *topB* sur un dérivé de pTrc99a) des souches RFM475 ($\Delta topA$) et SB383 ($\Delta topA \Delta rnhA$). Les souches RFM475 ($\Delta topA$) et SB383 ($\Delta topA \Delta rnhA$) portant le plasmide pPH1243 (*topB* cloné dans un dérivé de pTrc99a, Broccoli *et al.*, 2000) ont été cultivées à 37°C dans un milieu riche (LB) avec les antibiotiques appropriés et lorsque indiqué, avec de l'IPTG à 1mM. Lorsque les cellules ont atteint une DO_{600} de 0.4, les cultures ont été divisées en 2 et de la spectinomycine a été ajoutée à l'un des deux flacons, à une concentration de 400 $\mu\text{g/ml}$. Les cultures ont été incubées pendant 15 minutes avant d'être re- divisées en 2 et incubées à 37°C ou à 28°C pendant 1 heure. Les plasmides ont été extraits tel que décrit précédemment (Massé *et al.*, 1997). Le symbol [--] indique l'endroit sur le gel où migrent les plasmides hypersurenroulés négativement.

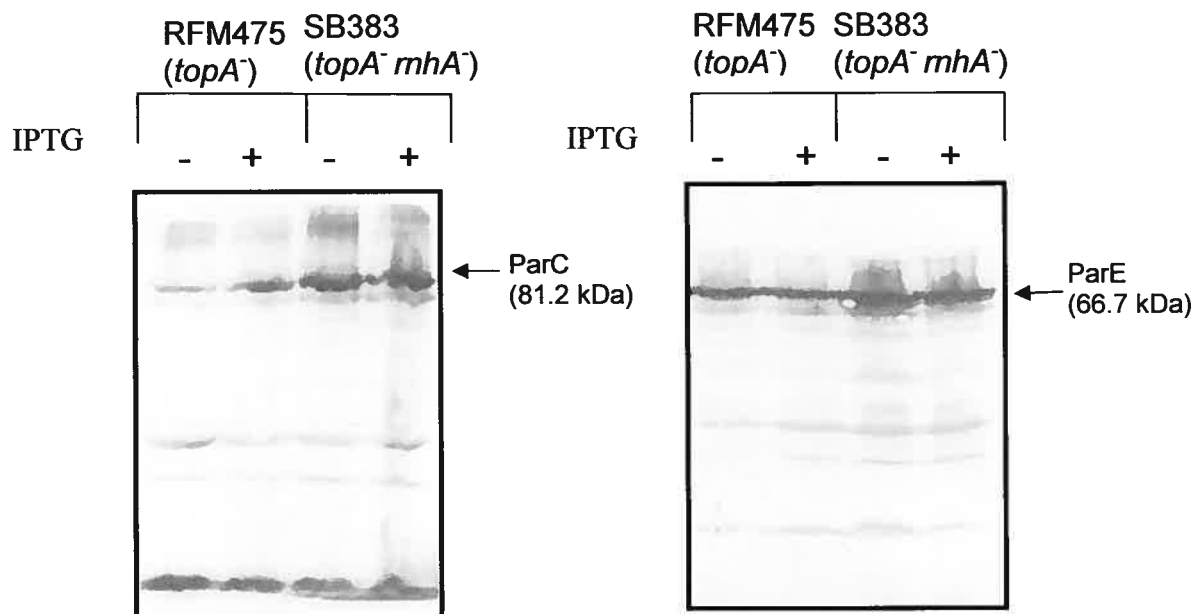


Figure 4. Analyse par Western des quantités relatives des sous- unité ParC et ParE de la topoisomérase IV dans les souches RFM475 ($\Delta topA$) et SB383 ($\Delta topA \Delta rnhA$). Les souches RFM475 ($\Delta topA$) et SB383 ($\Delta topA \Delta rnhA$) portant le plasmide pPH1243 (gène *topB* sur un dérivé de pTrc99a, Broccoli *et al.*, 2000) ont été cultivées dans un milieu riche (LB) en présence des antibiotiques appropriés. Les protéines totales ont été séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide et analysées par Western avec des anticorps de lapin anti ParC et anti- ParE.

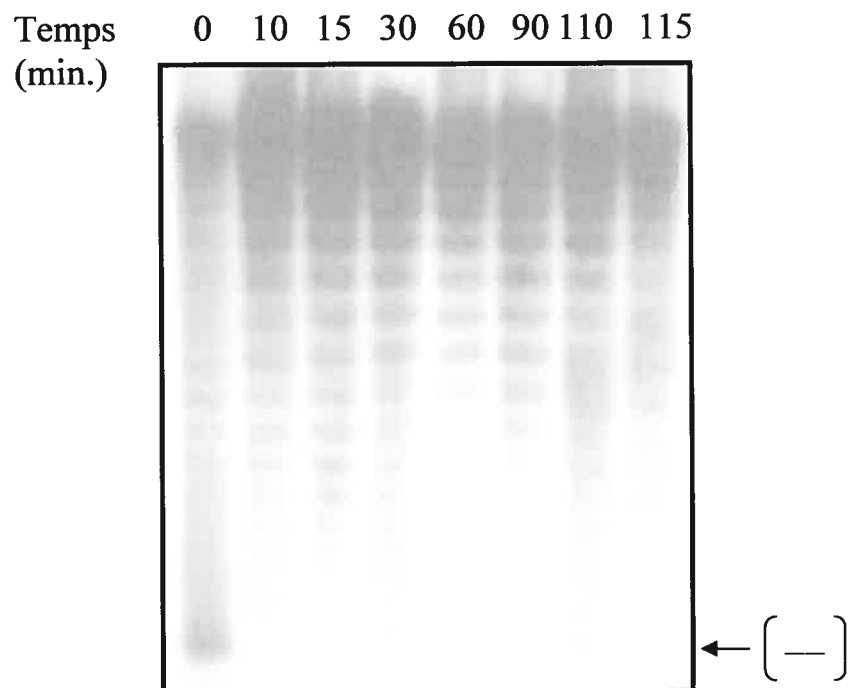


Figure 5. Hypersurenroulement négatif du plasmide pBR322 extrait chez la souche DM800 ($\Delta topA$) en fonction du temps à 37°C en présence de spectinomycine. La souche DM800 ($\Delta topA$) portant le plasmide pBR322 a été cultivée dans un milieu riche (LB+ ampicilline à 50 μ g/ml) jusqu'à une DO₆₀₀ de 0.4. Un échantillon a été prélevé (temps 0) et de la spectinomycine a été ajoutée au reste de la culture à une concentration finale de 400 μ g/ml. Des échantillons ont été prélevés aux temps indiqués et les plasmides ont été extraits tel que décrit précédemment (Massé *et al.*, 1997).

7. Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr. Marc Drolet, qui a non seulement fait preuve de beaucoup de patience au cours des années, mais qui a pris une chance en acceptant qu'une étudiante qu'il connaissait à peine vienne travailler dans son laboratoire sur un sujet qu'elle ne connaissait pas du tout. Merci de m'avoir fait confiance avec un projet aussi stimulant que complexe, et de m'avoir laissé la liberté d'apprendre par mes propres erreurs...

Je tiens également à remercier tous les autres membres de l'équipage : Chadi Hraiky, Charles Fortin, Imad Baaklini, Fabien Rallu, Julie-Annick Desabrais et Patrick Sanscartier. Vous avez fait du laboratoire un endroit où l'on vient non seulement pour travailler, mais aussi pour rire et discuter. Merci pour vos conseils, votre bonne humeur et votre amitié.

Merci à Pauline Phoenix. J'ai toujours été impressionnée par la quantité et la diversité de savoir que tu possèdes...mais je suis encore plus ébahie par ta grande patience, ta douceur et ta générosité. Merci pour tous les conseils précieux que tu m'as donné au fil des ans...en recherche et dans la vraie vie...

Merci à Éric Massé, le premier docteur du lab...Il n'a pas été facile de marcher dans tes traces. Je me souviendrai toujours de ton acharnement, de ta persévérance et de ton sens de l'humour...Merci pour tes nombreux conseils, ton aide technique inestimable et pour ta grande sagesse.

To Joe. Thank you for supporting every decision I made in order for this to become a reality. We both know that I would have quit a long time ago had it not been for your constant words of encouragement in that very difficult time. Thank you for being so understanding, so patient, and so honest. There IS more to life than what we do for a living...and I plan on living every bit of it with you...

